



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CÉLIA AKEMI HOGA

Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de
resíduo de 17β -estradiol em tabaqui por LC-MS/MS

Development and validation of analytical method for the determination of 17β -
estradiol residue in tabaqui by LC-MS / MS

CAMPINAS
2016

CÉLIA AKEMI HOGA

Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de resíduo de 17 β -estradiol em tabaqui por LC-MS/MS

Development and validation of analytical method for the determination of 17 β -estradiol residue in tabaqui by LC-MS / MS

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Mestra em Ciências de Alimentos.

Dissertation presented to the Faculty of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Food Science.

Orientador: Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
Coorientador: Dra. Karine Valadares Guimarães Reche

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Célia Akemi Hoga e orientada pelo Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

Campinas
2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 131875/2014-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

H678d Hoga, Célia Akemi, 1991-
Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de resíduo de 17b-estradiol em tambaqui por LC-MS/MS / Célia Akemi Hoga. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Felix Guillermo Reyes Reyes.
Coorientador: Karine Valadares Guimarães Reche.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. LC-MS/MS. 2. Hormônios. 3. Esteróides. 4. Tambaqui ^(Peixe). 5. Estradiol.
I. Reyes, Felix Guillermo Reyes. II. Reche, Karine Valadares Guimarães. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development and validation of analytical method for the determination of 17b-estradiol residue in tambaqui by LC-MS/MS

Palavras-chave em inglês:

LC-MS/MS

Hormones

Steroids

Tambaqui ^(Fish)

Estradiol

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Felix Guillermo Reyes Reys

Adriana Pavesi Ariseto Bragotto

Vera Lúcia Ferracini

Data de defesa: 10-01-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
(Orientador)
FEA/UNICAMP

Prof.^a Dr.^a Adriana Pavesi Ariseto Bragotto
(Membro Titular)
FEA/UNICAMP

Dr.^a Vera Lúcia Ferracini
(Membro Titular)
EMBRAPA

Dr.^a Nadia Regina Rodrigues
(Membro Suplente)
CPQBA/UNICAMP

Dr.^a Regina Prado Zanes Furlani
(Membro Suplente)
Instituto de Tecnologia de Alimentos- ITAL

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmico do aluno.

AGRADECIMENTO

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes pela orientação, profissionalismo, objetividade, dedicação e, sobretudo, amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da UNICAMP, pela oportunidade de crescimento intelectual e vivência acadêmica permitida aos alunos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao João Kleber e Karine Valadares da empresa Microbióticos Análises Laboratoriais, pela ajuda técnica e científica na realização do trabalho.

À Fernanda Ferreira Loureiro de Almeida e Vanessa Ribeiro Reis da Embrapa Amazônia Ocidental por fazer parte do projeto e pela ajuda com os materiais para a realização do trabalho.

À Patrícia Braga e ao pessoal do laboratório pela amizade, ajuda técnica e científica durante a realização do trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelo gentil aceite do convite de participação e suas contribuições pertinentes ao trabalho.

Enfim, gostaria de agradecer a todos aqueles que, direta e indiretamente, contribuíram com desenvolvimento, ideias, informações, correções e opiniões do trabalho.

RESUMO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a segunda maior produção de pescado no Brasil e a primeira na região Norte do país. Devido à grande demanda de tambaqui, produtores e pesquisadores estão procurando uma maneira que seja fácil e eficiente para aumentar a produtividade desse peixe. Assim, com a finalidade de contribuir com o avanço da criação comercial do tambaqui, a Embrapa Amazônia Ocidental vem pesquisando a utilização de 17β -estradiol, um hormônio com atividade estrogênica, para a formação de população monossexo de fêmeas de tambaqui. Essa técnica de indução sexual é uma maneira de o peixe ter uma maior taxa de ganho de peso corporal. Isso é possível quando, na mesma espécie, um sexo apresenta superioridade zootécnica em relação ao outro. Todavia, esse hormônio deve ser utilizado com muito cuidado, pois além de contaminar o ambiente e modificar a biota exposta a ele, também pode causar modificações no sistema endócrino, gerando consequências negativas à saúde do consumidor e/ou de seus descendentes. Portanto, necessita-se de estudos para verificar se na carne do peixe que recebeu tratamento de 17β -estradiol, há quantidade de resíduo de hormônio que possa oferecer risco à saúde humana. Visando atender essa necessidade, o objetivo deste projeto foi o desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação de resíduo de 17β -estradiol no músculo de tambaqui, utilizando LC-MS/MS. O método foi aplicado na determinação de resíduos desse composto no fillet de peixes tratados com o hormônio.

Palavras Chaves: Indução Sexual, Hormônio, Monossexo, Tambaqui, 17β -estradiol.

ABSTRACT

Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is the second largest fish production in Brazil and the first in the North of the country. Due to the great demand for tambaqui, producers and researchers are looking for an easily and efficient way to increase the productivity of this fish. In order to contribute to the advancement of commercial breeding of tambaqui, Embrapa Western Amazon is conducting a research that employs a hormone with estrogenic activity, 17β -estradiol, for the formation of monosex populations of tambaquis females. This sexual induction technique is a way for the fish to have a higher tax of body weight gain. This is possible when, in the same specie, one sex shows zootechnical superiority over the other. Nevertheless, this hormone should be used very carefully, since it could contaminate the environment and modify the biota exposed to it. Also, its residues in food can induce changes in the endocrine system causing adverse effects to the health of consumers and / or their descendants. Thus, studies are needed to evaluate if the meat, from fish that received treatment of 17β -estradiol, contain hormone residue that may pose a risk to human health. In order to attend this need, the purpose of this study was to develop and validate an analytical method, using LC-MS/MS, to determine 17β -estradiol residues in tambaqui muscle. The method was applicated in the determination of residues of this compound in the fish muscle of fishes treated with this hormone.

Keywords: Sexual Induction, Hormones, Monosex, Tambaqui, 17β -estradiol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do tratamento hormonal.	59
Figura 2 - Fluxograma de preparo de amostra.	61
Figura 3 – Cromatogramas com diferentes <i>clean up</i> na concentração de 17β -estradiol de 1 ng.g^{-1} . O <i>clean up</i> foi feito com adição (A) apenas de MgSO_4 , (B) MgSO_4 e C18, e (C) MgSO_4 e PSA.	66
Figura 4 – Cromatogramas da A) matriz branca, da B) matriz branca fortificada e do C) 17β -estradiol puro em solvente, na concentração de 1 ng.g^{-1}	68
Figura 5 – Representação gráfica da curva de calibração do ensaio de 17β -estradiol.	70
Figura 6 – Cromatogramas onde A) refere-se ao LOQ, B) LOD e C) branco da matriz.	73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1-Androgens and estrogens used for reversal and differentiation of sex in different species of fish.	23
Table 2 –Gonadotropin hormones used to induce maturation and spawning in different species of fish.	27
Table 3 - Bibliographic survey for the determination of residue of hormones in several matrices.	33
Table 4 - Bibliographic survey of LC analysis methods to determine hormones in fishery products.	38

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Parâmetros utilizados no espectrômetro de massas.	62
Tabela 2– Cálculo de F (Fischer-Snedecor) para avaliação do efeito matriz.	69
Tabela 3 – Cálculo de t (Student) para avaliação do efeito matriz.	69
Tabela 4 – Resultados obtidos através do cálculo de recuperação.	71
Tabela 5 – Resultados obtidos do cálculo da precisão do método analítico (repetibilidade e reprodutibilidade).	71
Tabela 6 – Resultados da avaliação de robustez.	75
Tabela 7 – Resumo dos resultados dos parâmetros avaliados em comparação com seus critérios de aceitação.	76

LISTA DE QUADRO

Quadro 1- Classificação dos métodos analíticos com as características de desempenho que devem ser determinadas.	67
--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	13
CAPÍTULO 1. ASPECTS RELATED TO THE USE OF HORMONES IN FISH FARMING AND TO THE DETERMINATION OF THEIR RESIDUES IN FISH MUSCLE: A REVIEW	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUCTION.....	19
2. THE USE OF HORMONES IN FISH FARMING	21
2.1. Sex Reversal.....	21
2.2. Artificial Reproduction	25
2.3. Impact of the hormone on the environment and consumer health	28
3. METHODS OF ANALYSIS FOR DETERMINATION OF HORMONE RESIDUES IN SEVERAL MATRICES	30
4. CONCLUSION	40
5. ACKNOWLEDGEMENT	41
6. REFERENCES.....	41
CAPÍTULO 2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO DE 17 β -ESTRADIOL EM MÚSCULO DE TAMBACUI POR LC-MS/MS	50
RESUMO.....	51
ABSTRACT	52
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. OBJETIVOS.....	56
2.1. OBJETIVO GERAL	56
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1. MATERIAIS.....	57
3.1.1. Solventes e reagentes.....	57
3.1.2. Padrões e soluções.....	57
3.1.3. Equipamentos	58
3.2. MÉTODO	58
3.2.1. Obtenção das amostras	58
3.2.2. Preparo das amostras	59
3.2.3. Preparo das curvas analíticas	61
3.2.4. Desenvolvimento do método analítico por LC-MS/MS.....	61
3.2.5. Validação do método analítico	62

3.2.6. Verificação de 17β -estradiol no músculo de tambaqui tratado	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO	66
4.1.1. Especificidade e seletividade	67
4.1.2. Efeito Matriz	68
4.1.3. Linearidade	69
4.1.4. Recuperação.....	70
4.1.5. Repetibilidade e reprodutibilidade	71
4.1.6. LOD, LOQ, CC α e CC β	72
4.1.7. Robustez.....	74
4.2. ANÁLISE DO MÚSCULO DE TAMBAQUI TRATADO COM 17β -ESTRADIOL.....	75
5. CONCLUSÃO	77
6. REFERÊNCIAS.....	77
DISCUSSÃO GERAL.....	81
CONCLUSÃO GERAL	83
REFERÊNCIAS	84
ANEXO	95

INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento da renda da população brasileira tem refletido em aumento no consumo de bens e serviços e, em particular, no mercado de alimentos. Dentro do consumo de alimentos, destaca-se o crescimento da demanda de alimentos saudáveis, tais como peixes. A demanda mundial pelo pescado também vem aumentando junto com a população. Segundo o relatório da FAO (2016), o Estado Mundial da Pesca e Aquicultura 2016 (SOFIA), o consumo de pescado *per capita* em nível mundial registrou, em 2014, um aumento médio de 20,1 kg de pescado por habitante. A demanda por esses produtos tende a crescer e por isso importa aos países investir cada vez mais nessa área.

A produção de pesca e aquicultura no Brasil também vem crescendo. Em 2015 a produção de peixe cresceu 1,5 % (BRASIL, 2015b). Esse crescimento se deve aos variados sistemas de criação desenvolvidos com o propósito de atender a demanda mundial de pescado, bem como a sustentabilidade econômica e ambiental.

As principais espécies de peixes criadas na piscicultura brasileira são a tilápia (*Oreochromis niloticus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*). A tilápia, peixe exótico, é a primeira maior produção de pescado no Brasil, tendo produzido 219 mil toneladas em 2015, equivalendo a 45,4% do total da produção nacional. O tambaqui, peixe nativo criado na região da Amazônia, é a segunda maior produção de pescado no Brasil. Em 2015 atingiu 135 mil toneladas, peso este que corresponde a 28,1% da produção brasileira. Essa criação é maior no Norte do País, principalmente no estado de Rondônia, que responde por 47,7% da produção nacional e 60,7% da produção regional (BRASIL, 2015b).

O tambaqui é uma das principais espécies nativas de peixes criados no Brasil. Sua carne, muito apreciada, é a preferida dos amazonenses e representa um alto valor comercial e de grande importância para a economia regional (SANTOS *et al.*, 2010). Além de apresentar várias características biológicas, como crescimento rápido, grande porte, alta tolerância a baixas concentrações de oxigênio, resistência a doenças, ser onívoro e rústico, a espécie demonstra fácil aceitação às rações artificiais e uma boa adaptação a

diferentes sistemas de criação (MEROLA e PAGÁN-FONT, 1988; SANTOS *et al.*, 2010; HANCZ, 1993).

O primeiro estudo sobre a criação de tambaqui foi realizado na década de 70 (MEROLA e PAGÁN-FONT, 1988) e, desde então, diversos estudos de produção de tambaqui foram realizados ao longo dos anos. Uma das características estudada é que a fêmea apresenta maior taxa de ganho de peso corpóreo do que o macho, devido à maturação sexual da fêmea ser mais tardia (IZEL *et al.*, 2013).

Nos vários tipos de sistema de criação, o uso de hormônios na piscicultura é uma técnica pouco difundida. Essa técnica é usada para reversão sexual (mudança de sexo) e reprodução artificial. Para a reversão sexual, o hormônio é usado quando um sexo apresenta superioridade zootécnica em relação ao outro da mesma espécie (ALMEIDA, 2013), o que é comum em teleosteo e ocorre durante a puberdade (TARANGER *et al.*, 2010). Já para a reprodução artificial, o hormônio é utilizado para induzir ou atrasar a maturação gonadal do peixe, permitindo que a desova seja realizada alguns meses antes ou depois do período normal da reprodução. Tanto para feminização quanto para masculinização, os hormônios utilizados mais conhecidos correspondem aos estrógenos e andrógenos, naturais ou sintéticos. Para o controle da maturação gonadal são usados extrato hipofisário de peixes maduros e vários tipos de hormônio liberadores de gonadotropina (ANDRADE, YASUI, 2003; ALMEIDA, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2014). Além do uso de hormônios, fatores exógenos como fotoperíodo, temperatura ou propriedades da água (ALMEIDA, 2013) são, de alguma forma, percebidos pelo organismo, induzindo a maturação sexual ou puberdade do peixe.

A utilização de produtos hormonais controla a produtividade, aumentando e gerando excedentes exportáveis. Por outro lado, há o risco de causar problemas na saúde do consumidor, como intoxicação alimentar e acumulação de resíduos hormonais no seu organismo, entre outros.

O uso indiscriminado de hormônios nos animais pode provocar impacto ambiental e prejuízos para a saúde humana e animal. Alguns exemplos: aparecimento de distúrbios endócrinos, tais como problemas de desenvolvimento sexual prematuro e cisto ovariano (EPSTEIN, 1990), indução de puberdade precoce, avanços na idade óssea com repercussões negativas

no crescimento, e modificação dos caracteres sexuais (DUARTE; SILVA; MEIRELLES, 2002). Também o desenvolvimento de câncer pode ser causado devido à ingestão de produto alimentício de origem animal contaminado com resíduo de hormônio (CARDOSO *et al.*, 1999). Caso seja introduzido no meio ambiente, o hormônio pode induzir nos seres aquáticos, involuntariamente, respostas estrogênicas como a mudança de sexo e de ciclo de reprodução. Para impedir esses acidentes, no Brasil é executado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1999), através do Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCRC - o controle sobre os resíduos nos alimentos, em decorrência do uso de agrotóxicos, medicamentos veterinários ou de acidentes envolvendo contaminantes ambientais, objetivando garantir a qualidade do sistema de produção de alimentos de origem animal ao longo das cadeias produtivas.

O hormônio mais utilizado com o propósito de mudança de sexo nos peixes, para ganhar vantagem econômica, é o 17β -estradiol (E_2), hormônio feminino, e o 17α -metiltestosterona, hormônio masculino. Ambos são facilmente metabolizados alguns meses após o período do tratamento (PIFERRER, 2001; PANDIAN e SHEELA, 1995; MAINARDES-PINTO, 2000). O 17α -metiltestosterona foi muito usado em trabalhos para masculinização de tilápia do Nilo, enquanto que o 17β -estradiol (E_2) foi utilizado na feminização do tambaqui em projeto desenvolvido pela Embrapa da Amazônia Ocidental, de caráter estritamente científico, pois, no Brasil não há legislação que permita ou proíba o uso de 17β -estradiol (E_2) para indução sexual fenotípica em peixes. Todavia, segundo a Portaria nº 51, de 24 de maio de 1991, é proibido o uso de substâncias com atividade anabolizante, de caráter hormonal ou não, para fins de crescimento e ganho de peso dos animais de abate (BRASIL, 1991). E, conforme a legislação da União Europeia (EC,2010), o uso do 17β -estradiol é permitido apenas para propósitos terapêuticos e zootécnicos, não sendo requerido LMR (limite máximo de resíduo).

Os métodos analíticos comumente empregados na determinação qualitativa de resíduos de hormônios são por radioimunoensaio (RIA) e método imunoenzimático (ELISA), e na determinação quantitativa é a cromatografia líquida em geral, e a cromatografia gasosa acoplada a detectores por espectrometria de massa (CG-EM) (ZANARDI, 2007). Toda metodologia exige

a etapa de preparação da amostra para melhorar a detectabilidade dos analitos de interesse, que seriam a etapa de extração e, na maioria dos casos, clean up. Dos estudos realizados para a determinação de hormônio em pescado foram testadas várias extrações, tais como a extração líquido-líquido (ROTHBARD *et al.*, 1990; XU *et al.*, 2006), extração em fase sólida molecularmente impresso (JIANG *et al.*, 2009), microextração de fibra em fase sólida revestido por polímero molecularmente impresso (HU *et al.*, 2010), extração assistida por micro-ondas dinâmica acoplado com extração salting-out líquido-líquido (WANG *et al.*, 2012), extração de líquido pressurizado e QuEChERS (JAKIMSKA *et al.*, 2013). Essa última tem sido largamente utilizada, independente da matriz, para determinar resíduos de contaminantes, apresentando no seu procedimento uma etapa de clean up utilizando adsorvente para ajudar na remoção de interferentes e minimizando o efeito matriz.

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação de resíduo de 17β -estradiol no músculo de tambaqui, utilizando LC-MS/MS. O método foi aplicado na determinação de resíduos desse composto no filé de peixes tratados com o hormônio visando à reversão sexual. Ainda, foi realizada uma revisão bibliográfica sobre o uso de hormônios na aquicultura, os possíveis impactos na saúde humana, animal e no ambiente, e de aspectos analíticos a respeito da determinação de resíduos de hormônios em matrizes derivadas da aquicultura.

**CAPÍTULO 1. ASPECTS RELATED TO THE USE OF HORMONES IN FISH
FARMING AND TO THE DETERMINATION OF THEIR RESIDUES IN FISH
MUSCLE: A REVIEW**

Celia A. Hoga; Fernanda L. Almeida; Felix G. R. Reyes

(To be submitted to Journal of Aquaculture)

ABSTRACT

The use of hormones in fish farming is one of the techniques used to increase fish production, both for artificial reproduction and for an increase in growth rate which is valid only for teleost fish, which has as a characteristic that, on the same species, one sex presents zootechnical superiority in relation to the other. The hormone most used in the artificial reproduction is the crude extract of the pituitary gland of mature fish, being that this technique is used to advance or delay the breeding period of the fish, in order to be marketed all year round, not just at a certain period. The technique to increase the growth rate of the fish is known as sex reversal and the most common hormones used in this sex-change technique are the steroids estrogens and androgens. However, they must be handled very carefully since, besides contaminating the environment and modifying the biota exposed to the hormone, they can also induce changes in the endocrine system causing adverse effects to the consumer health and / or their descendents. Therefore, the aim of this review is to discuss the techniques related to the use of hormones in fish farming, the possible impacts in humans, animal and environmental health, and the current methods of analysis for determining the residues of hormones in several food matrices, especially in fish.

Keywords: Fish, hormone, artificial reproduction, sexual reversion, endocrine effects.

1. INTRODUCTION

The demand for fish has increased in the recent years due to population growth and to the constant search for healthy diet. According to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) (Brazil, 2015), in 2015, compared to the previous year fish farming increased 1.5 % of the total fish production, and the Brazilian aquaculture has been growing strongly in all regions of Brazil. This growth is due to advances on the technical management of fish cultivation to cope with the world demand for fish, also seeking economic and environmental sustainability. In the Brazilian pisciculture scenario, tilapia (*Oreochromis niloticus*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*) are the main species of fish farmed.

Hormones are chemical messengers responsible for communication between different types of cells that recognizes their identity and function through receptors, which are protein structures specialized in molecular recognition. After the proximity and the interaction hormone-receptor, a series of biochemical reactions leading to specific biological responses occur.

Steroids are hormones produced from cholesterol and can be grouped into five subgroups based on structural characteristics: estrogens, androgens, progestogens, glucocorticoids and mineralcorticoids (Guedes-Alonso *et al.*, 2014). The three formers compose the group of sex steroids. The most important sex hormones used in fish farming are the estrogens and androgens, and they can be used as a natural (from nature) or synthetic (synthesized or produced in laboratory) product.

Hormones in aquaculture are mainly used for two purposes: sex reversal and artificial reproduction. The first can be used when growth rate and/or gain weight are different between male and female. This difference between genders is very common in teleost and usually occurs during the puberty (Taranger *et al.*, 2010). In other words, hormones are used to reverse males into females or females into males, for example tilapia (Singh, 2013). The second reason is more common, and fundamental for seed production, which allow aquaculture to become possible: artificial (induced) reproduction of broodstock.

The use of hormonal products controls the productivity by increasing and generating exportable surpluses. On the other hand, disastrous consequences may occur, such as food poisoning and accumulation of hormone residues in organisms, among others. In Brazil, these consequences are mainly related to misuse of licensed products by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) and / or by the use of unlicensed products, reducing the effectiveness and promoting violation on the programs of residue controls. Importantly, according to NBR ISO 22000 (ABNT, 2006), the term "food safety" means that food should not contain (or be exposed) to biological, physical or chemical hazards that may cause damage to human health.

Nowadays, most issues related to food safety aims at residue control in foods due to use of pesticides, veterinary drugs or accidents involving environmental contaminants chemicals. Anabolic residues in meat, for instance, can cause serious problems to human health. According to Epstein (1990), 3,000 children in Puerto Rico had serious problems of premature sexual development and ovarian cysts due to ingestion of meat products with residues of zeranol (xenobiotic anabolic agent with estrogenic activity promoting growth). According to the FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) eating foods contaminated with steroids can lead to endocrine disorders (JECFA, 1988), and may even develop cancer (Cardoso *et al.*, 1999). Nevertheless, for 17 β -estradiol the Committee established an acceptable daily intake (ADI) of 0-50 ng.kg⁻¹ body weight, on the basis of a no-observed adverse effect level (NOAEL) of 0.3 mg.day⁻¹ (equivalent to 5 μ g.kg⁻¹ body weight per day) from studies of changes in several hormone-dependent parameters in postmenopausal women. For progesterone, an ADI of 0-30 μ g.kg⁻¹ body weight was established on the basis of a low observed adverse effect level (LOAEL) of 200 mg.day⁻¹ (equivalent to 3.3 mg.kg⁻¹ body weight) for changes in the uterus, and an ADI of 0-2 μ g.kg⁻¹ body weight was established for testosterone on the basis of a NOEL of 100 mg.day⁻¹ (equivalent to 1.7 mg.kg⁻¹ body weight per day) in a study of eunuchs (JECFA, 2000).

Canada, Australia, New Zealand, Argentina and the United States allow the use of natural steroid hormones such as testosterone, progesterone and 17 β -estradiol (E₂), as well as the synthetics zeranol and trenbolone acetate. In those countries, only residues from synthetic compounds with maximum residue

levels (MRLs) are controlled, because they are considered as the most potent estrogenic compounds (Duarte *et al.*, 2002). In Brazil, since 1991, the importation, production, marketing and use of natural or artificial substances for growth purposes and/or fattening of animals intended for food production have been prohibited. Some substances, natural or synthetic, with estrogen or progestagen action are allowed only for therapeutic purposes, estrous cycle synchronization and preparation of donors and recipients for embryo transfer (Brazil, 1991; Brazil, 1994). In 1995, the Codex Alimentarius established that the use of hormones 17 β -estradiol, testosterone and progesterone would be safe to human health when used in accordance with good animal husbandry practice, as well as trenbolone acetate and zeranol, in doses lower than 2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (JECFA, 1988). On the other hand, diethylstilbestrol was considered potentially toxic (Palermo-Neto, 1998).

Generally, immunoassays are the method of detection of hormone residues, which are used for qualitative determination routine, while liquid chromatography (LC) methods are indicated for quantitative purposes (Zanardi, 2007).

The main goal of this article is to review the literature available since 1978 on the use of hormones in fish farming, as well as the qualitative and quantitative analytical methods for determination of hormone residues in various matrices from aquaculture.

2. THE USE OF HORMONES IN FISH FARMING

2.1. Sex Reversal

The sex reversal can be achieved with hormonal treatment during sex differentiation. Fish sex may be separated into genotype, determined by the genes responsible for the gonads formation, and phenotype, which is the appearance of the ovary or testis. The phenotype differentiation occurs naturally, generally earlier in female than in males, during the ontogeny of the

fish larvae (Piferrer, 2001). This process is very complex but it can be manipulated by the use of androgen and estrogen hormones.

The use of hormones in fish farming for sex reversal aims the production of monosex population, in order to increase growth rate or weight gain. Commercially, it is advantageous to rear individuals of the most profitable gender, also achieving more uniform lots, and controlling undesirable breeding (Singh, 2013). There are two ways of hormonal treatment to produce monosex population of fish: i) direct, by which the fish are treated with hormones for the purpose of developing the desired sex, and ii) indirect, by which parental or breeders are treated with hormones to obtain neomale ($XX\♂$), neofemale ($XY\♀$, $ZZ\♀$) and supermale ($YY\♂$), and with them getting the entire batch of larvae of the same sex (Piferrer, 2001).

For fish feminization, the 17β -estradiol (E_2) is the main hormone used in different teleost species such as eels, salmonids, cichlids, cyprinids, anabantids, poeciliidae, ictaluridae and catfish. Among androgens, the 17α -methyltestosterone (synthetic) has been widely employed to reverse females into males. Both steroids have the advantage of being easily metabolized after the period of hormonal treatment (Piferrer, 2001; Pandian and Sheela, 1995; Mainardes-Pinto, 2000; Zanoni *et al.*, 2013). Table 1 shows hormones used for reversal and differentiation of sex in different species of fish for both, male and female induction.

The administration of the hormone for sex reversal treatment can be: systemic (direct injection and silastic implantation), by immersion technique or by dietary supplementation (hormone incorporated in fish feed) (Pandian and Sheela, 1995). Commercially, the most successful treatments are by immersion and diet as both methods reach a large number of fish, while the systemic transfer method is expensive and require technique skill to be applied on the fish. In the immersion, not only the dose administered affects the efficiency of hormonal treatments, but also other parameters such as type of hormone, water temperature and exposure time. The addition of hormone in the feed is more efficient because it is easily controlled, and it required optimum steroid dose to induce complete sex reversal of all individuals (Piferrer, 2001; Pandian and Sheela, 1995).

Table 1-Androgens and estrogens used for reversal and differentiation of sex in different species of fish.

Hormone	Fish specie	Reference
17 β -estradiol	Rainbow trout (<i>Salmo gairdneri</i>).	Johnstone <i>et al.</i> , 1978.
	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>).	Johnstone <i>et al.</i> , 1978.
	Atlantic halibut (<i>Hippoglossus hippoglossus</i> L.).	Hendry <i>et al.</i> , 2003.
	Summer flounder (<i>Paralichthys dentatus</i>).	Specker and Chandlee, 2003.
	Bagrid catfish (<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>).	Park <i>et al.</i> , 2004.
	Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>).	Lin <i>et al.</i> , 2012.
	Common snook (<i>Centropomus undecimalis</i>).	Passini, 2013.
17 α -ethynylestradiol	Tilapia (<i>Oreochromis aureus</i>).	Melard, 1995.
Estradiol valerate	Tetra (<i>Astyanax altiparanae</i>).	Bem, 2009.
Tamoxifen	Bagrid catfish (<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>).	Park <i>et al.</i> , 2004.
17 α -methyltestosterone	Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>).	Haffray <i>et al.</i> , 2009.
	NileTilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>).	Curtis <i>et al.</i> , 1991; Mainardes-Pinto <i>et al.</i> , 2000; Toyama <i>et al.</i> , 2000; Hayashi <i>et al.</i> , 2002; Zanardi <i>et al.</i> , 2011; El-Sayed <i>et al.</i> , 2012; Zanoni <i>et al.</i> , 2013.
	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).	Tabata <i>et al.</i> , 1999.
	Tilapia (<i>Oreochromis Mossambicus</i>).	Johnstone <i>et al.</i> , 1983.
	Rainbow trout (<i>Salmo gairdneri</i>).	Johnstone <i>et al.</i> , 1983; Johnstone <i>et al.</i> , 1978.
	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	Johnstone <i>et al.</i> , 1978.
17 α -methyl-dihydrotestosterone	Atlantic halibut (<i>Hippoglossus hippoglossus</i> L.)	Hendry <i>et al.</i> , 2003.
	Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)	Lin <i>et al.</i> , 2012.
17 α -ethynyltestosterone	Tilapia hybrids (<i>Oreochromis niloticus</i> x <i>O. aureus</i>)	Rothbard <i>et al.</i> , 1990.

Most of the authors above mentioned used 17β -estradiol, estradiol valerate, 17α -methyltestosterone or 17α -methyl Dihydrotestosterone (by immersion and diet technique) to produce all-female population by the direct and indirect feminization (on the other hand, androgen is used to masculinize of females, producing neomales) (Piferrer, 2001). Females are produced due to the common problems associated with male precocious sexual maturity and advantage associated to female grows faster than male. Those authors obtained great results on the effects of hormone on the proportions of sexual types (Johnstone *et al.*, 1978; Tabata *et al.*, 1999; Hendry *et al.*, 2003; Specker and Chandless, 2003; Park *et al.*, 2004; Haffray *et al.*, 2009; Bem, 2009; Lin *et al.*, 2012). The author which used implant method tested different doses of the hormone and verify that at high doses of 17β -estradiol (higher than 8 mg.kg^{-1}) all fishes died and showed liver injury (Passini, 2013).

For production of all-male population it has been used tamoxifen (substance that blocks the estrogen receptor), 17α -methyltestosterone, 17α -ethynyltestosterone and 17α -ethynylestradiol by direct and indirect masculinization (use of estrogen to feminize genotypic males rearing neofemale; Piferrer, 2001) in the species where males grow faster and reach a larger size than females (Rothbard *et al.*, 1990; Johnstone *et al.*, 1983; Curtis *et al.*, 1991; Melard, 1995; Mainardes-Pinto *et al.*, 2000; Toyama *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2004; Zanardi *et al.*, 2011; El-Sayed *et al.*, 2012; Zanoni *et al.*, 2013).

According to Pandian and Sheela (1995), the advantages of hormonal treatment ensure maximum growth, lower ornamental fish production cost, eliminate early maturation in males and allow broodstock management. The disadvantages of the technique are related to: possible presence of residues of carcinogenic steroids that can affect consumers health; hormonal induction of sex reversal can become a stressful process resulting in low survival rates; delayed sexual maturity and reduction of fish fertility; high doses can lead to sterility, sexual paradoxical reversal and growth suppression; and on a large scale, sexual reversal may become a technique to pollute the environment because more than 99 % of hormones are metabolized and released within hours or days in the waters.

Treatments with sex reversal hormones are conducted at the fish initial stage of development, before or during the process of sexual differentiation of the gonads, i.e. at least few months before being marketed (Almeida, 2013; Bem, 2009). The residue of E₂, for instance, disappears in less than a month after the end of the treatment, meaning no risk of meat contamination by hormones by the time of harvest. According to Specker and Chandlee (2003), for Summer flounder (*Paralichthys dentatus*), larvae and juvenile, after 24h whole-body estradiol levels were not statistically different from untreated controls. As E₂ is a natural steroid it is, therefore, quickly metabolized and excreted, it is also a steroid with less impact on the environment (Piferrer, 2001; Hendry *et al.*, 2003; Specker and Chandlee, 2003). Treating Rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Johnstone *et al.* (1978) estimated that 95-99 % of the E₂ injected disappeared from the water in a period up to 72 hours.

2.2. Artificial Reproduction

Another use of hormones in aquaculture is the seed production, i. e., artificial reproduction, which has the purpose of manipulating the gonad maturation of the fish.

Artificial reproduction has endless applications by using exogenous hormones in order to induce/advance or delay/arrest the fish maturation, and spawning in a few months earlier or later than normal season. By advancing the period of reproduction, the fish farmers get great flexibility in the marketing of larvae and young fish. By restricting spawning to a certain period, maximizes time and resources, allowing higher throughput and turn over of nursery ponds. By synchronizing spawning males and females the farmer obtains fingerlings in periods where profitability is higher (Lee *et al.*, 1986; Venturieri and Bernardino, 1999).

Hormonal techniques for fish breeding are based in the intramuscular or intraperitoneal injection in broodstocks. The oldest and still the most used hormone is the crude extract of the pituitary gland (PE) of mature fish (carp and salmon). Another hormone largely used is the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) of mammals (mGnRH) and salmon (sGnRH). Gonadotropin-

releasing hormone analogous (GnRHa), human gonadotropin (GtHs), dopamine antagonists (pimozide, domperidone, metoclopramide and reserpine) and synthetic hormone similar to gonadotropins (Ovopel) have been tested in several species to induce or block the sexual maturation (Zohar and Mylonas, 2001; Almeida, 2013; Araújo *et al.*, 2014).

The advantages of GnRH are that by being active at very low concentrations, its use is relatively cheap, its function is at the beginning of the hormonal cascade, stimulating the fish to produce its own gonadotropin and it is not highly species-specific (Venturieri and Bernardino, 1999). The GtHs may also be used to induce maturation as they acts, as the pituitary extract, directly on the gonads. However, the cost of GtHs is much higher than PE and the method is not well suitable for many species yet (Andrade and Yasui, 2003). Zohar and Mylonas (2001) summarize that GnRHa and GtHs had been used to induce maturation and spawning on more than 30 species of fish.

The advantage of the use of dopamine antagonists is that it blocks the mechanism inhibitor of dopamine, elevating the GnRH secretion into the blood stream inducing maturation, and the most used and recommended is domperidone (Szabó *et al.*, 2002; Levavi-Silvan *et al.*, 2004; Heyrati *et al.*, 2007; Dasgupta *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009) as it is cheap, potent and does not cross the blood-brain barrier. When GnRH alone does not work properly, usually it is used in combination with dopamine antagonists (Venturieri and Bernardino, 1999; Almeida, 2013). The use of gonadotropin hormones to induce maturation and spawning in different fish species is shown in Table 2.

The authors above mentioned conducted studies using the hormones to induce maturation and spawning of fish, most of them compared the different types of gonadotropin hormone by results obtained on fertilization rate, latency period, spawning rate, quantity and quality of eggs and hatching rate (Szabo *et al.*, 2002; Levavi-Sivan *et al.*, 2004; Heyrati *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Garber *et al.*, 2009; Vazirzadeh *et al.*, 2011).

Table 2 –Gonadotropin hormones used to induce maturation and spawning in different species of fish.

Hormone	Fish species	Reference
Luteinizing hormone-releasing hormone analogous (LHRHa)	Milkfish (<i>Chanos chanos Forsskal</i>)	Lee <i>et al.</i> , 1986.
	Black sea bass (<i>Centropristis striata</i>)	Berlinsky <i>et al.</i> , 2005.
	Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)	Garber <i>et al.</i> , 2009.
Carp pituitary extract	Nase (<i>Chondrostoma nasus</i>)	Szabó <i>et al.</i> , 2002.
	Kutum (<i>Rutilus frisii kutum</i>)	Heyrati <i>et al.</i> , 2007.
	Wild loach (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)	Wang <i>et al.</i> , 2009
	Carp (<i>Cyprinus carpio carpio</i>)	Vazirzadeh <i>et al.</i> , 2011.
	Amazon catfish (<i>Leirius marmoratus</i>)	Araújo <i>et al.</i> , 2014.
Gonadotropin-releasing hormone analogous (GnRHa) +dopamine antagonists	Nase (<i>Chondrostoma nasus</i>)	Szabó <i>et al.</i> , 2002.
	Silver perch (<i>Bidyanus bidyanus</i>)	Levavi-Sivan <i>et al.</i> , 2004.
	Kutum (<i>Rutilus frisii kutum</i>)	Heyrati <i>et al.</i> , 2007.
	Rohu (<i>Labeo rohita</i>)	Dasgupta <i>et al.</i> , 2009.
	Wild loach (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)	Wang <i>et al.</i> , 2009.
	Carp (<i>Cyprinus carpio carpio</i>)	Vazirzadeh <i>et al.</i> , 2011.
Gonadotropin-releasing hormone analogous (GnRHa)	Nase (<i>Chondrostoma nasus</i>)	Szabó <i>et al.</i> , 2002.
	Dusky grouper (<i>Epinephelus marginatus</i>)	Marino <i>et al.</i> , 2003.
	Greater amberjack (<i>Seriola dumerili</i>)	Mylonas <i>et al.</i> , 2004.
	Silver perch (<i>Bidyanus bidyanus</i>)	Levavi-Silvan <i>et al.</i> , 2004.
	Rose snapper (<i>Lutjanus guttatus</i>)	Ibarra-Castro and Duncan, 2007
	Kutum (<i>Rutilus frisii kutum</i>)	Heyrati <i>et al.</i> , 2007.
	Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)	Garber <i>et al.</i> , 2009.
	Wild loach (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)	Wang <i>et al.</i> , 2009.
	Honeycomb grouper(<i>Epinephelus merra</i>)	Kanemaru <i>et al.</i> , 2012.
	Senegalese sole (<i>Solea senegalensis</i>)	Rasines <i>et al.</i> , 2013.
	meagre (<i>Argyrosomus regius</i>)	Mylonas <i>et al.</i> , 2013.
	Longfin yellowtail (<i>Seriola rivoliana</i>)	Fernández-Palacios <i>et al.</i> , 2015.
Synthetic hormone similar to gonadotropin (Ovaprim)	Freshwater rotifer (<i>Brachionus calyciflorus</i>)	Sugumar and Munuswamy, 2006.
	asp (<i>Aspius aspius</i>)	Targońska <i>et al.</i> , 2010.
	Pinfish (<i>Lagodon rhomboids</i>)	DiMaggio <i>et al.</i> , 2013.

Synthetic hormone similar to gonadotropin (Ovopel)	asp (<i>Aspius aspius</i>)	Targońska <i>et al.</i> , 2010.
	Amazon catfish (<i>Leiarius marmoratus</i>)	Araújo <i>et al.</i> , 2014.
Human Chorionic Gonadotropin (hCG)	Silver perch (<i>Bidyanus bidyanus</i>)	Levavi-Sivan <i>et al.</i> , 2004.
	Pinfish (<i>Lagodon rhomboids</i>)	DiMaggio <i>et al.</i> , 2013.

Ovopel is a synthetic hormone composed of combination of the mGnRHa and dopamine antagonist (metoclopramide). It was used to induce the reproduction of wild mature asp (*Aspius aspius*) during out-of-season spawning (Targońska *et al.*, 2010) and to induce spermiation on Amazon catfish (*Leiarius marmoratus*) (Araújo *et al.*, 2014). Ovaprim is a synthetic hormone that contains combination of the sGnRHa and dopamine antagonist (domperidone). It was used to develop a reliable technique for inducing population growth, mictic female production and body size in the freshwater rotifer (*Brachionus calyciflorus*) (Sugumar and Munuswamy, 2006), to compare results obtained with Ovopel (Targońska *et al.*, 2010) and to evaluate the effects of various doses on ovulation and spawning in pinfish (*Lagodon rhomboids*) (DiMaggio *et al.*, 2013).

2.3. Impact of the hormone on the environment and consumer health

The 17 β -estradiol residue in fish meat disappears in less than a month after finishing the sex reversal treatment. Besides, this steroid causes small impact on the environment by being natural and quickly metabolized and excreted. The residue of 17 α -methyltestosterone is also rapidly metabolized after the period of the hormonal treatment (Piferrer, 2001). Moreover, after spawning and ending of the reproductive activities, the levels of the hormones involved on the gonadal activities return to their baseline levels, which in many species of fish that means to almost zero or undetectable levels (Almeida, 2013). Thus, theoretically, it should not be found a high level of these hormones in fish meat if the treatment was done in a correct manner and period.

However, recent studies contradict some previously published data. Thus, according to Reis Filho *et al.* (2006), natural estrogens are continuously introduced into the environment (by human excretion which follows the sewage

disposal system and after entering the environment), even at low concentrations (around nanograms per liter), which gives them a feature of persistence. These estrogens introduced into the environment could affect wildlife and human health by disrupting their normal endocrine systems, such as feminization effects of males, altered sex ratio of offspring, infertility, reduced fertility, inhibition of the development of sexual organs and sexual reversal.

The way to detect if the reproductive system of aquatic organisms were affected by estrogen is by the level of vitellogenin (VTG) in blood plasma of an organism. Vitellogenin is a protein that has an important role in female reproductive system of oviparous vertebrate. It is synthesized in the liver, regulated by estrogen and transported via the blood to the ovaries, which are incorporated in the development of the eggs. If an increase is observed in VTG plasma level of an organism it means that it was exposed to a certain concentration of substances with estrogenic activity, causing feminization on fish when the exposure occurs during the critical period of sexual differentiation. Although the concentrations of these hormones are very low (in the order of ng.L^{-1} and $\mu\text{g.L}^{-1}$), they can be sufficient to induce VTG synthesis in male fish (Bila and Dezotti, 2003).

Other way that hormones are introduced into the environment is by the water, contain residues of these compounds when used in the treatment of fish, that was wrongly or illegally discarded. The contamination could be originated by the fish excretion, as well as from the medicated feed that remains unconsumed by fish. According to some authors (Johnstone *et al.*, 1983; Leonhardt, 1997; Specker and Chandlee, 2003) the liver metabolize the hormones in water soluble compounds, and around 99 % of the administered hormone through the diet, on the sex reversal, is metabolized and released into the water by bile and urine excretion, within a few hours or days after treatment. The estrogens are excreted mainly as inactive conjugates of sulphuric and glucuronic acids which do not have direct biological activity, but they can act as precursor hormone reservoirs able to be reconverted to free steroids with estrogenic activities by bacteria in the environment, such as the microorganisms of the raw sewage and sewage treatment plants (Ying *et al.*, 2002). In other words, sex reversal technique becomes able to pollute the environment.

In specific studies have demonstrated that the use of hormone does not result in residue accumulation in tissues of reversed fish with hormones. Thus, Rothbard *et al.* (1990) showed that in the muscle of Tilapia hybrids treated for 11 weeks, with diet containing 60 mg.kg⁻¹ of 17 α -ethynyltestosterone, it was detected high concentration of the steroid only on the day 0 (142.1 ng.g⁻¹) and day 1 (168.6 ng.g⁻¹) after the last exposure to the hormone. The samples taken on day 3, 5 and 7 did not differ from the untreated controls (17 α -ethynyltestosterone concentrations were below the detectable level of 50 ng.g⁻¹). Curtis *et al.* (1991) fed the Nile Tilapia, for 30 days, with diets that contained 30 mg.kg⁻¹ of 17 α -methyltestosterone. The hormone concentration decreased logarithmically from day 1 to day 10 after treatment. Nevertheless, towards those compounds there is still concern about their impact on the human (consumption of treated fish) and environmental health.

In humans, the exposure to hormones can cause endocrine disorders such as early puberty in children, advances in bone age with negative repercussions on growth, modification of sexual characteristics and development of cancer (Cardoso *et al.*, 1999). These disorders occur especially in children because they are in the growing phase when puberty is not developed yet. Thus, Partsch & Sippell (2001) reported that precocious pseudopuberty could be induced in children by oral or dermal exposure to estrogen-containing food or ointments, respectively, if they were chronically exposed, and the food (meat) derived from high doses treated animals. In Milan, Bahrain, Puerto Rico and Jerusalem there were reported cases of gynecomastia, thelarche, pubarche and precocious sexual development in children, induced by consumption of poultry, meat, milk and cereals contaminated with estrogen, or even their precursors, or by contamination of drinking water by substances with estrogenic activity (Alves *et al.*, 2007).

3. METHODS OF ANALYSIS FOR DETERMINATION OF HORMONE RESIDUES IN SEVERAL MATRICES

Determining hormone residues in foods from animal origin is a difficult task, first because of the matrices complexity, and second because of the low

concentration level that need to be quantified, in the order of $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (or $\mu\text{g.L}^{-1}$) and ng.kg^{-1} (or ng.L^{-1}) (Guedes-Alonso *et al.*, 2014). In most analyses involving actual samples, a substantial clean-up of the extract and analyte concentration during the sample preparation step are necessary to isolate the target compounds from the matrix and to achieve required limits for detection and quantification.

To determine hormone residues in samples from the environment and in foods, analytical methods have been developed in order to identify and quantify these substances in simple and complex matrices. In this regard, according to Zanardi (2007), analytical methods for detecting hormone residues are, generally, immunoassays, such as radioimmunoassay (RIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which are routinely used for qualitative determination. High performance thin layer chromatography (HPTLC) and gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) can also be an important tool for steroids determination, in general. Nonetheless, for quantitative determinations, analytical methods using liquid chromatography (LC) coupled with several types of detectors is the most widespread techniques. For hormones determination, the most common detectors coupled to LC are: electrochemical, ultraviolet diode array (DAD), fluorescence, UV-Vis, mass spectrometry (MS) and tandem mass spectrometry (MS/MS) (Reis Filho *et al.*, 2006). Table 3 summarizes analytical methods reported for determination of hormones in several matrices.

Gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) permits the simultaneous determination of many analytes with detection limit in the order of ng.kg^{-1} or ng.L^{-1} (ppt), but the sample preparation is laborious and time-consuming. To turn the molecules volatile, the most used derivatization technique has been silylation and acetylation (Zhou and Zhang, 2011). Hartmann *et al.* (1998) investigated 12 steroids in beef, veal, milk, milk products, pork, meat products, poultry, eggs, fish, plants, yeast and fermented alcoholic beverages matrix using GC-MS. For each matrix, different sample preparations were studied by evaluating the recovery of spiked samples. The authors reported residue levels between 0.03 to $1.41 \mu\text{g.kg}^{-1}$ for 10 steroids, except estrogens that were not detectable. Long *et al.* (2007) reported a GC-MS method for the identification and quantitative determination of 17β -estradiol residues in the muscle of various fishery products. It was made extraction,

clean-up and derivatization to enhance detection sensitivity. Great linearity and precision were obtained and the method was successfully applied to the analysis of samples from the retail market.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is simple and economical to use, and is especially suitable for screening large numbers of hormonally active substances with a great sensitivity. ELISA does not cause serious problems in the discarding samples because it does not require the use of reagents dangerous to human and environmental health (Zhou and Zhang, 2011). Zanardi *et al.* (2011) analysed tilapia carcass samples by ELISA, using the Interkit, to determine testosterone at residue concentration level of ng.g^{-1} . The authors reported recovery values of 69.9 %.

For the simultaneous separation of analytes, liquid chromatography (LC) is performed mainly in reversed phase (C18 columns). Several spectroscopic techniques, such as ultraviolet (UV), fluorescence and diode - array (DAD) have been used in LC determination of hormone residues. Nevertheless, the detectors most used are MS or MS/MS, which makes the separation of the analytes by mass/charge (m/z) of ions. To generate analytes ionic charged, the most used interface ionization techniques are electrospray (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI), both in negative or positive ion mode (Zhou and Zhang, 2011). The use of either, ESI or APCI, will depend on the analyte to be analyzed. In general, for the chromatographic separation the mobile phase mainly consist of acetonitrile or methanol with water, and could contain or not, low level of an organic acid or base to help in the ionization of the compounds to be analyzed.

The MS/MS detection system uses two stages of mass spectrometry (MS1 and MS2), the first is used to isolate the ion of interest, and the second is used to make the relationship of this ion with others from which it may have been generated, or which it may generate on decomposition (Ardrey, 2003). Recently, the LC-MS/MS system have become more popular and widely used in food analysis, because it has high specificity and detectability in the determination of residue levels of contaminants in complex matrices. However, there is the disadvantage that LC-MS/MS systems are not accessible to all laboratories for routine analysis, due to the high cost of the equipment and the requirement for an experienced operator.

Table 3 - Bibliographic survey for the determination of residue of hormones in several matrices.

Methods	Matrix	Analyte	Reference
LC/UV-Vis	Fishery products	ETES	Rothbard <i>et al.</i> , 1990.
		E1, E2, E3, EE	Hu <i>et al.</i> , 2010.
	Animal foods	E2, E3, PRO, BOL, TES	Shi <i>et al.</i> , 2011.
	Sediment	METES	Falone, 2007.
	Water	METES	Falone, 2007.
		E2, EE	Fernandes <i>et al.</i> , 2011.
	Yogurt	E2, E3, PRO, BOL, TES	Shi <i>et al.</i> , 2011.
LC/Fluorescence	Fishery products	E2, E3, DES	Jiang <i>et al.</i> , 2009.
	Water	E2	Lopes <i>et al.</i> , 2010.
LC/DAD	Water	E1, E2, E3, EE, MES, DES	Alda and Barcelo, 2001.
		E1, E2, E3, EE	Verbinnen <i>et al.</i> , 2010.
		E1, E2, α E2, E3, EE, PRO, NORET, NORG, MES	Almeida and Nogueira, 2015.
	Urine	E1, E2, α E2, E3, EE, PRO, NORET, NORG, MES	Almeida and Nogueira, 2015.
LC-MS/MS	Bovine urine	NORTES, TES, PRO	Draisci <i>et al.</i> , 2000.
	Bovine serum	NORTES, TES, PRO	Draisci <i>et al.</i> , 2000.
		E2, α E2	Ferretti <i>et al.</i> , 2008.
	Animal food	E1, E2, E3, EE, DES, METES, TES, TBL, NAN, HEX, DIEN, STAN	Shao <i>et al.</i> , 2005;
		EPITES, NAN, METES, PTS, MEPRO, PRO, E1, E2, E3, EE	Xu <i>et al.</i> , 2006

		AP, BOL, CMA, FMT, MPA, MGA, MEBOL, METES, NE, NORG, NORTES, PRO, 16-OH-STAN, TES, TBL	Blasco <i>et al.</i> , 2007
		DES, E2, EE, BOL, NORTES, METES, TBL, TRIAM-ACE, DEXA, FMS, ZOL, Z, ZEA, MGA, MPA	Kaklamanos <i>et al.</i> , 2009;
		NAD, TBL, BOL, FMT, NAN, AED, MDROL, TES, DHEA, METES, AND, STAN, DHT, NET, 17-HPT, 21-HPT, NORG, MGA, MEPRO, CMA, PRO, MPA, TRIAM, PRD, PRNL, CORT, CORS, FMS, DEXA, FCN-ACE, MPRNL, TRIAM-ACE, FML, BDS, E1, E2, E3, EE, DES, HEX, DIEN, MEST, MEAND, DAN, MESOL, ALD, BEC, FLUA, PCL	Yang <i>et al.</i> , 2009;
		CMA, MPA, MGA, PTS, NORG, METES, NAN, α -Z, E1, E2, α E2, E3, EE, EV, DES	Wang <i>et al.</i> , 2010
		AED, TES, PRO, STAN, 17-HTP, PRNL, PRD, HCORT, MGA, MPA	Fan <i>et al.</i> , 2014.
	Water	E1, E2, EE	Ingrand <i>et al.</i> , 2003.
		E1, E2, E3, EE, E1-3S, E1-3G, E2-3S, E2-3G, E2-17G, E2-3G17S, E2-3S17G, E2-3,17DiS, E3-3S, E3-3G	Isobe <i>et al.</i> , 2003.
	Fishery products	EPITES, NAN, METES, PTS, MEPRO, PRO, E1, E2, E3, EE	Xu <i>et al.</i> , 2006;
		COR, E1, α E2, E3, MEPRO, PRO, 17-HPT, TES, NORTES	Wang <i>et al.</i> , 2012
		PRO, NORG, E1, E2, E3, EE, E1-3S	Jakimska <i>et al.</i> , 2013;
GC/MS	Foods, meats and vegetables.	P5, ADD, HTP, DHEA, DHT, AND, α E2, E3	Hartmann <i>et al.</i> , 1998.
	Bovine liver	DES, Z	Cardoso <i>et al.</i> , 1999.
	Fishery products	E2	Long <i>et al.</i> , 2007.
RIA	Bovine liver	DES, Z	Cardoso <i>et al.</i> , 1999.
	Fishery products	E2	Specker and Chandlee, 2003.
ELISA	Fishery products	METES	Zanardi <i>et al.</i> , 2011.

Abbreviation: 16-OH-stan (16- β -Hydroxystanozolol); 17-HPT (17 α -hydroxyprogesterone); 21-HPT (21 α -hydroxyprogesterone); ADD (androstenedione); AED (4-Androstene-3,17-dione); ALD (Aldosterone); AND (androsterone); AP (acetoxypregesterone); BDS (budesonide); BEC (Beclomethasone); BOL (boldenone); CMA (chlormadinone acetate); COR (corticosterone); CORS (cortisol); CORT (cortisone); DAD (ultraviolet diode array); DAN (Danazol); DES (diethylstilbestrol); DEXA (dexamethasone); DHEA (dehydroepiandrosterone); DHT (dihydrotestosterone); DIEN (dienestrol); E1 (estrone); E1-3G (estrone-3-glucuronide); E1-3S (estrone-3-sulfate); E2 (17 β -estradiol); E2-17G (estradiol-17-glucuronide); E2-3,17DiS (estradiol-3,17-disulfate); E2-3G (estradiol-3-glucuronide); E2-3G17S (estradiol-3-glucuronide-17-sulfate); E2-3S (estradiol-3-sulfate); E2-3S17G (estradiol-3-sulfate-17-glucuronide); E3 (estriol); E3-3G (estriol-3-glucuronide); E3-3S (estriol-3-sulfate); EE (17 α -ethynylestradiol); ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay); EPITES (epitestosterone); ETES (17 α -ethynyltestosterone); EV (estradiol valerate); FCN-ACE (fluocinolone acetonide); FLUA (Fludrocortisone acetate); FML (fluorometholone); FMS (flumethasone); FMT (fluoxymesterone); GC-MS (gas chromatography - mass spectrometry); HCORT (hydrocortisone); HEX (hexestrol); LC (Liquid chromatography); MDROL (methandrostenolone); MEAND (Methylandrostenediol); Mebol (methylboldenone); MEPRO (medroxyprogesterone); MEPRO (medroxyprogesterone); MES (mestranol); MESOL (Mestanolone); MEST (Mesterolone); METES (17 α -methyl-testosterone); MGA (megestrol acetate); MPA (medroxyprogesterone acetate); MPRNL (methylprednisolone); MS/MS (tandem mass spectrometry); NAD (19-nor-4-Androstene-3,17-dione); NAN (nandrolone); NE (northandrolone); NET (19-norethindrone); NORET (19-norethisterone); NORGE (levonorgestrel ou Norgestrel); NORTES (19-nortestosterone); P5 (pregnenolone); PCL (Clobetasol propionate); PRD (prednisone); PRNL (prednisolone); PRO (progesterone); PTS (testosterone 17-propionate); RIA (radioimmunoassay); STAN (stanozolol); TBL (trenbolone); TES (testosterone); TRIAM (triamcinolone); TRIAM-ACE (triamcinolone acetonide); UV-Vis (ultravioleta -visible spectrophotometry); ZEA (zearalenone); ZOL (zearalenol); α E2 (17 α -estradiol); α -Z (α -Zeranol).

Several studies have been reported in the literature using LC-MS/MS to determine hormone residues in various matrices, and allowing the determination of a large number of compounds with high precision and sensitivity (Guedes-Alonso *et al.*, 2014). In this regard, a sample preparation step prior to the chromatographic separation is usually necessary and important and can include several steps such as filtration, extraction, clean up, purification, evaporation, hydrolysis, derivatization, among others (Reis Filho *et al.*, 2006).

Extracting hormones from water (including drinking water, groundwater, surface water and effluents from sewage treatment plants, sewage, marine sediments, soil and biological sludge) is usually performed by solid phase extraction (SPE) disks or cartridge. Steroid hormones are excreted by humans and reach daily the aquatic environment through sewage systems. Thus, several authors have stated that municipal wastewater is the main source of contamination of aquatic environments (Alda and Barcelo, 2001; Alda *et al.*, 2003; Isobe *et al.*, 2003; Ingrand *et al.*, 2003; Bila and Dezotti, 2007; Lopes *et al.*, 2010; Verbinnen *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2011; Guedes-Alonso *et al.*, 2014; Almeida and Nogueira, 2015)

Even though several articles have been published on the steroid residues determination in matrices such as water, sediments, products of animal origin such as beef, chicken, pork, milk, egg, etc., the determination of hormone residues in fish matrices has been seldom reported, even though fish farming is of growing economically importance. In Table 4 it is reported LC methods of analysis to determine hormone residues in fishery products. Procedures of analysis including extraction, recovery, detection and quantification limits, and their references for determination of hormones residues in fishery sample are presented.

Rothbard *et al.* (1990) were one of the first authors that reported hormone residue determination in fish (tilapia muscle). The authors used liquid-solid extraction with chloroform:methanol (2:1; v/v), centrifugation, drying and redissolved the extract in 200µL of slightly warmed 80 % methanol. The clean up step was conducted onto a SEP-PAK C18 cartridge and the detection by UV-vis. The recovery was too low (56.1 %) in comparison to that reported (80.0-94.1 %) by Hu *et al.* (2010) that used the same detection technique to

determine the residues of 4 estrogens in fish and shrimp. The authors used MIP-coated fiber for extraction of estrogens in fishery samples and demonstrated higher extraction efficiency than the three commercial SPME fiber investigated by them (polydimethylsiloxane, polydimethylsiloxane/divinylbenzene and carbowax/template resin fiber). The MIP-coated SPME fiber was very stable, and could be repeatedly used more than 100 times for standard solutions.

Molecularly imprinted polymer (MIP) is a synthetic polymer with specific binding sites complementary size, shape, and functional groups to the template molecule, involving a retention mechanism based on molecular recognition. The advantages of MIP (stable, ease of preparation, low cost, and reusability) have led to their wide application in chromatography, catalysis, chemical sensors, and solid-phase extraction. Jiang *et al.* (2009) used MIP as a SPE sorbent (MISPE) to selectively extract E2 from fish and prawn tissue prior to HPLC analysis because the MIP showed affinity for 17β -estradiol in acetonitrile solution, which was confirmed by absorption experiments. The MISPE method could eliminate all matrix interference simultaneously, and showed good recoveries (78.3–84.5 %).

Xu *et al.* (2006) using LC-MS/MS reported recovery in the range of 64-75 % and low quantitation limits ($0.12\text{--}0.54\text{ ng.g}^{-1}$) for 10 anabolic steroids. The authors describe a relatively simple sample preparation procedure using enzymolysis. After that the sample was extracted with tert-butyl methyl ether and cleaned up through reverse solid-phase extraction.

DMAE-SLLE was an effective technique in reducing the sample preparation time and solvent consumption. Dynamic Microwave-Assisted Extraction (DMAE) has been developed to avoid the degradation or contamination of the analytes and salting-out liquid-liquid extraction (SLLE) is a classic homogeneous liquid-liquid extraction method using salt (ammonium sulfate, sodium chloride, ammonium acetate, sodium sulfate, and magnesium sulfate) to induce phase separation. Thus, Wang *et al.* (2012) used DMAE-SLLE and ammonium acetate as a mass spectrometry friendly salt and could obtain higher recoveries (75.3-95.4 %).

Table 4 - Bibliographic survey of LC analysis methods to determine hormones in fishery products.

ANALYTE	MATRIX	EXTRACTION	CLEAN-UP	REC. (%)	FE	FM	DET.	LOD	LOQ	REF.
ETES	Tilapia muscle	chloroform: methanol (2:1; v/v)	C18-SPE	56.1	HPLC BondapakC18 column (7.8 x 300 mm; 10µm)	H ₂ O, ACN + 0.1%TFA 1 mL/min and 2 mL/min	UV-vis	50 ng.g ⁻¹	-	Rothbard <i>et al.</i> , 1990.
EPITES, NAN, METES, PTS, MEPRO, PRO, E1, E2, E3, EE	Fish muscle	tert-butyl methyl ether	C18-SPE	64-75	Supelco DiscoveryC18 column (150x2.1mm; 5µm)	ACN, H ₂ O 0.3 mL/min	MS/MS	0.06–0.22 ng.g ⁻¹	0.12–0.54 ng.g ⁻¹	Xu <i>et al.</i> , 2006.
E2, E3, DES	Tilapia and prawn	MISPE	-	78.3–84.5	ODS C18 (VP-ODS, 150x4.6mm, 5µm)	H ₂ O, MeOH 1.0mL/min	Fluorescence	0.023 mg.L ⁻¹	0.076 mg.L ⁻¹	Jiang <i>et al.</i> , 2009.
E1, E2, E3, EE	Fish and shrimp	MIP- SPME	-	80.0-94.1	Diamonsil C18 column (250x4.6mm, 5µm)	ACN, 0.12% acetate buffer 1.0mL/min	UV-Vis	0.98 – 2.39µg.L ⁻¹	-	Hu <i>et al.</i> , 2010.
COR, E1, αE2, E3, MEPRO, PRO, 17-	Fish muscle	DMAE- SLLE	SPE	75.3-95.4	Zorbax Eclipse C18 column (150x4.6mm,	ACN, H ₂ O 0.8 mL/min	MS/MS	0.03 – 0.15 ng.g ⁻¹	0.11 – 0.47 ng.g ⁻¹	Wang <i>et al.</i> , 2012.

HPT, TES, NORTES	3.5µm)									
PRO, NORG, E1, E2, E3, EE, E1-3S	Fish muscle	PLE, QuEChERS	GPC, Florisil, PSA/ C18	40-103	Acquity BEH C18 column (50×2.1 mm, 1.7µm)	MeOH, H ₂ O (pH9) 0.4 mL/min	MS/MS	0.002 – 3.09 ng.g ⁻¹	0.005 – 9.26 ng.g ⁻¹	Jakimska <i>et al.</i> , 2013.

Abbreviation: 17-HPT (17 α -hydroxyprogesterone); COR (corticosterone); DES (diethylstilbestrol); DMAE-SLLE (Dynamic Microwave-Assisted Extraction Coupled with Salting-out Liquid-liquid Extraction); E1 (estrone); E1-3S (estrone-3-sulfate); E2 (17 β -estradiol); E3 (estriol); EE (17 α -ethynylestradiol); EPITES (epitestosterone); ETES (17 α -ethynyltestosterone); GPC (Gel permeation chromatography); MEPRO (medroxyprogesterone); METES (17 α -methyl-testosterone); MIP-SPME (Molecularly imprinted polymer coated solid-phase microextraction fiber); MISPE (Molecularly imprinted solid-phase extraction); NAN (nandrolone); NORG (Norgestrel ou levonorgestrel); NORTES (19-nortestosterone); PLE (Pressurized liquid extraction); PRO (progesterone); PTS (testosterone 17-propionate); SPE (Solid-phase extraction); TES (testosterone); α E2 (17 α -estradiol).

Jakimska *et al.* (2013) selected three extraction methods for comparison on the basis of their applicability to biota samples and rapidity. The first extraction protocol consisted on pressurized liquid extraction (PLE) followed by gel permeation chromatography (GPC) clean-up. The second extraction method was PLE extraction followed by Florisil clean-up. And the third approach was based on QuEChERS which involved two steps, liquid–liquid partitioning followed by the application of specific salt (this study tested 3 different salts: MgSO₄, NaCl; MgSO₄, sodium acetate; MgSO₄, NaCl, trisodium citrate dehydrate, disodium hydrogencitrate sesquihydrate) used for salting out of water from the sample. The clean up step with dispersive solid phase extraction (dSPE) was tested using four sorbent mixtures (MgSO₄, PSA; MgSO₄, PSA, C18; MgSO₄, PSA, C18, GCB; MgSO₄, PSA, GCB). The PLE with GPC clean-up was considered an inefficient method because only five out of the nineteen compounds had recoveries higher than 40 %, and the PLE with Florisil clean-up, allowed the extraction of most of the compounds, however, estrone metabolite was still not extracted from the matrix. So, the QuEChERS method allowed the simultaneous extraction of all target compounds, provided satisfactory recoveries and it was chosen as the most efficient method. The best results were obtained for the combination of the extraction salt composed with sodium acetate and MgSO₄, and the dSPE sorbent composed with MgSO₄, PSA and C18. This combination gave the most satisfactory results since this sorbents mixture is dedicated to samples with high lipid content.

4. CONCLUSION

Based on data from the literature, the most common hormone for female reversal into male is 17 α -methyltestosterone. It has the advantage of been easily excreted soon after the period of hormonal treatment. Another hormone widely cited in the literature is 17 β -estradiol, it is a natural hormone and is used in the production of female monosex. Breeding induction treatments in various fish species have been tested over the years to achieve production of high quality and quantity eggs and alevins, especially out of season. The hormone use in aquaculture for sex reversal and artificial reproduction tends to improve

the cost/productivity. However, care must be taken in order to produce the least possible environmental impact, rendering sustainability to the fish sector.

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem is one of the best alternatives to determine hormone residues regardless of the matrix; it allows qualitative analysis on a large number of compounds and quantitative analysis of residues of these compounds with high precision and sensitivity with shorter analysis time. Currently, the analytical methods intended for the determination of hormone residues in foods, and in particular in fish, are focused on quantitation of several analyte residues simultaneously (multi-residues determination).

5. ACKNOWLEDGEMENT

The authors gratefully acknowledge the financial support received from São Paulo Research Foundation-Agilent (FAPESP-Agilent Grant # 2013/50452-5) and the Brazilian National Council of Technological and Scientific Development (CNPq, Process nº 131875/2014-0 and 305390/2013-9). We also thank the Writing Department/General Coordination of Unicamp, for their assistance in translation of the manuscript.

6. REFERENCES

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2006. NBR ISO 22000: Sistemas de gestão da segurança de alimentos – Requisitos para qualquer organização na cadeia produtiva de alimentos. Rio de Janeiro.
- Alda, M. J. L. de, Barcelo, D., 2001. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 911: 203–210.
- Alda, M. J. L. de, Díaz-Cruz, S., Petrovica, M., Barcelo, D., 2003. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A*, 1000: 503–526.

- Almeida, C., Nogueira, J. M. F., 2015. Determination of steroid sex hormones in real matrices by bar adsorptive microextraction (BA μ E). *Talanta*, 136: 145–154.
- Almeida, F.L., 2013. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, 37(2): 174-180. Available from: <www.cbra.org.br>.
- Alves, C., Flores, L. C., Cerqueira, T. S., Toralles, M. B. P., 2007. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 23(5): 1005-1014.
- Andrade, D. R., Yasui, G. S., 2003. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, 27(2): 166-172.
- Araújo, J. E. X. S., Jr, D. P. S., Ribeiro, J. S. de A., Martins, E. de F. F., Souza, F. N., Oliveira, C. A. L. de, Ribeiro, R. P., Lopera-Barrero, N. M., Povh, J. A., 2014. Ovopel and Carp Pituitary Extract as Spawning Inducers in Males of the Amazon Catfish *Leirius marmoratus* (Gill, 1970). *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 57(6): 882-886.
- Ardrey, R. E., 2003. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, Wiley: Huddersfield.
- Bem, J. C. de, 2009. Desenvolvimento gonadal inicial e reversão sexual em *Astyanax altiparanae* (Teleostei, characidae). 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- Berlinsky, D. L., King V, W., Smith, T. I. J., 2005. The use of luteinizing hormone releasing hormone analogue for ovulation induction in black sea bass (*Centropristis striata*). *Aquaculture*, 250: 813– 822.
- Bila, D. M. e Dezotti, M., 2003. Fármacos no meio ambiente. *Quim. Nova*, 26(4): 523-530.
- Bila, D. M. e Dezotti, M., 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Quim. Nova*, 30(3): 651-66.
- Blasco, C., Poucke, C. V., Peteghem, C. V., 2007. Analysis of meat samples for anabolic steroids residues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1154: 230–239.
- Brasil, 1991. Ministério da Agricultura. Portaria nº 51 de 24 de maio de 1991. *Diário Oficial da União*, Brasília. Seção I, p.9989.
- Brasil, 1994. Ministros de Estado da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária - MAARA. Relatório apresentado pelos membros da comissão nomeada pelo Ministério da Agricultura, do Abastecimento e Reforma Agrária através da portaria nº. 51 sobre o uso de promotores do crescimento hormonal em pecuária de corte. Brasília. 130p.

- Brasil, 2015. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Produção da Pecuária Municipal – 2015. Prod. Pec. munic., Rio de Janeiro, 43: 1-49.
- Cardoso, O. M. C.; Silva, T. J. P.; Santos, W. L. M., 1999. Ocorrência de resíduos de dietilestilbestrol e zeranol em fígado de bovinos abatidos no Brasil. Ciênc. Tecnol. Alim., Campinas, 19(3): 1001–1014.
- Curtis, L. R.; Diren, F. T.; Hurley, M. D.; Seim, W. K.; Tubb, R. A., 1991. Disposition and elimination of 17- α -methyltestosterone in Nile tilapia. Aquaculture, Amsterdam, 99(1): 193-201.
- Dasgupta, S., Sarkar, S. K., Sarangi, N., Bhattacharya, S., 2009. Variation in spawning responses, egg and larvae productions from induced rohu (*Labeo rohita*) during pre-monsoon and monsoon seasons: Relationship with hormonal changes and oocyte responsiveness during final maturation. Aquaculture, 290: 320–326.
- DiMaggio, M. A., Broach, J. S., Ohs, C. L., 2013. Evaluation of Ovaprim and human chorionic gonadotropin doses on spawning induction and egg and larval quality of pinfish, *Lagodon rhomboides*. Aquaculture, 414–415: 9–18.
- Draisci, R., Palleschi, L., Ferretti, E., Lucentini, L., Cammarata, P., 2000. Quantitation of anabolic hormones and their metabolites in bovine serum and urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 870: 511–522.
- Duarte, K. M. R., Silva, F. M. S. M. da, Meirelles, C. F., 2002. Resíduos de anabolizantes na produção animal: Importância e métodos de detecção. Cienc. Rural, Santa Maria, 32(4): 731-737.
- El-Sayed, A. M., Abdel-Aziz, E. H., Abdel-Ghani, H. M., 2012. Effects of phytoestrogens on sex reversal of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae fed diets treated with 17 α -Methyltestosterone. Aquaculture, 360–361: 58–63.
- Epstein, S. S., 1990. Chemical additives in beef industry. Section on environmental health policy. Int. J. Health Serv., New York, 20(2): 277-280.
- Falone, S. Z., 2007. Desenvolvimento de métodos para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona em amostras de água e de sedimentos de piscicultura: ensaios ecotoxicológicos com cladóceros. 179f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Fan, Y., Yin, Y., Jiang, W., Chen, Y., Yang, J., Wu, J., Xie, M., 2014. Simultaneous determination of ten steroid hormones in animal origin food by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. Food Chemistry, 142: 170–177.
- Fernandes, A. N., Giovanela, M., Almeida, C. A. P., Esteves, V. I., Sierra, M. M. D., Grassi, M. T., 2011. Remoção dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -

etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfas decompostas como material adsorvente. *Quim. Nova*, 34(9): 1526-1533.

- Fernández-Palacios, H., Schuchardt, D., Roo, J., Hernández-Cruz, C., Izquierdo, M., 2015. Spawn quality and GnRHa induction efficiency in longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) broodstock kept in captivity. *Aquaculture*, 435: 167–172.
- Ferretti, G., Ferranti, C., Crovella, T., Fiori, M., Civitareale, C., Marchiafava, C., Quadri, F., Cammarata, P., Palleschi, L., 2008. Simultaneous analysis of 17α -estradiol and 17β -estradiol in bovine serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 871: 135–140.
- Garber, A. F., Fordham, S. E., Symonds, J. E., Trippel, E. A., Berlinsky, D. L., 2009. Hormonal induction of ovulation and spermiation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 296: 179–183.
- Guedes-Alonso, R., Montesdeoca-Esponda, S., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J. J., 2014. Liquid chromatography methodologies for the determination of steroid hormones in aquatic environmental systems. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 3–4: 14–27.
- Haffray, P., Petit, V., Guiguen, Y., Quillet, E., Rault, P., Fostier, A., 2009. Successful production of monosex female brook trout *Salvelinus fontinalis* using gynogenetic sex reversed males by a combination of methyltestosterone immersion and oral treatments. *Aquaculture*, 290: 47–52.
- Hartmann, S., Lacorn, M., Steinhart, H., 1998. Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food Chemistry*, 62(1): 7-20.
- Hayashi, C., Boscolo, W. R., Soares, C. M., Meurer, F., 2002. Exigência de Proteína Digestível para Larvas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a Reversão Sexual. *R. Bras. Zootec.*, 31(2): 823-828 (suplemento).
- Hendry, C. I., Martin-Robichaud, D. J., Benfey, T. J., 2003. Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 219: 769–781.
- Heyrati, F. P., Mostafavi, H., Toloei, H., Dorafshan, S., 2007. Induced spawning of kutum, *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) using (D-Ala⁶, Pro⁹-NEt) GnRHa combined with domperidone. *Aquaculture*, 265: 288–293.
- Hu, Y., Wang, Y., Chen, X., Hu, Y., Li, G., 2010. A novel molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber coupled with high performance liquid chromatography for analysis of trace estrogens in fishery samples. *Talanta*, 80: 2099–2105.
- Ibarra-Castro, L., Duncan, N. J., 2007. GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture*, 272: 737–746.

- Ingrand, V., Herry, G., Beausse, J., Roubin, M. R. de, 2003. Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1020: 99–104.
- Isobe, T., Shiraishi, H., Yasuda, M., Shinoda, A., Suzuki, H., Morita, M., 2003. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 984: 195–202.
- Jakimska, A., Huerta, B., Barganska, Z., Kot-Wasik, A., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2013. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers. *Journal of Chromatography A*, 1306: 44–58.
- JECFA. FAO/WHO - Expert Committee on Food Additives, 1988. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Geneva: World Health Organization, 41p. Technical Report Series, 763.
- JECFA. FAO/WHO - Expert Committee on Food Additives, 2000. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Geneva: World Health Organization, WHO Food additives series: 43.
- Jiang, T., Zhao, L., Chu, B., Feng, Q., Yan, W., Lin, J., 2009. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of 17-estradiol in fishery samples with high performance liquid chromatography. *Talanta*, 78: 442–447.
- Johnstone, R., Macintosh, D. J., Wright, R. S., 1983. Elimination of orally administered 17 methyltestosterone by *Oreochromis mossambicus* (tilapia) and *Salmo gairdneri* (rainbow trout) juveniles. *Aquaculture*, Amsterdam, 35: 249-257.
- Johnstone, R., Simpson, T.H. and Youngson, A.F., 1978. Sex reversal in salmonid culture. *Aquaculture*, 13: 115-134.
- Kaklamanos, G., Theodoridis, G., Dabalís, T., 2009. Determination of anabolic steroids in muscle tissue by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216: 8072–8079.
- Kanamaru, T., Nakamura, M., Murata, R., Kuroki, K., Horie, H., Uchida, K., Senthilkumaran, B., Kagawa, H., 2012. Induction of sexual maturation of the female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, in the non-breeding season by modulating environmental factors with GnRH analogue implantation. *Aquaculture*, 358–359: 85–91.
- Lee, C. S., Tamaru, C. S., Banno, J. E., Kelley, C. D., Bocek, A., Wyban, J. A., 1986. Induced maturation and spawning of milkfish, *Chanos chanos forsskal*, by hormone implantation. *Aquaculture*, 52: 199-205.

- Leonhardt, J. H., 1997. Efeito da reversão sexual em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). 141f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista - Campus Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Centro de Aquicultura, São Paulo.
- Levavi-Sivan, B., Vaiman, R., Sachs, O., Tzchori, I., 2004. Spawning induction and hormonal levels during final oocyte maturation in the silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture*, 229: 419–431.
- Lin, S., Benfey, T.J., Martin-Robichaud, D. J., 2012. Hormonal sex reversal in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture*, 364–365: 192–197.
- Long, Z., Hong, L., Jie, J., 2007. Determination of β -Estradiol Residues in Fish/Shellfish Muscle by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chin J Anal Chem*, 35(7): 983–987.
- Lopes, L. G., Marchi, M. R. R., Souza, J. B. G., Moura, J. A., Lorenzon, C. S., Cruz, C., Amaral, L. A., 2010. Estrôgenios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – São Paulo. *Quim. Nova*, 33(3): 639-643.
- Mainardes-Pinto, C. S. R., Fenerich-Verani, N., Campos, B. E. S. de, Silva, A. L. da, 2000. Masculinização da Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, Utilizando Diferentes Rações e Diferentes Doses de 17 α -Metiltestosterona. *Rev. bras. zootec.*, 29(3): 654-659.
- Marino, G., Panini, E., Longobardi, A., Mandich, A., Finoia, M.G., Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRHa implant. *Aquaculture*, 219: 841–858.
- Melard, C., 1995. Production of a high percentage of male offspring with 17 α -ethynylestradiol sex-reversed *Oreochromis aureus*. I. Estrogen sex-reversal and production of F2 pseudofemales. *Aquaculture*, 130: 25-34.
- Mylonas, C. C., Mitrizakis, N., Castaldo, C. A., Cerviño, C. P., Papadaki, M., Sigelaki, I., 2013. Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity II. Hormonal induction of spawning and monitoring of spawning kinetics, egg production and egg quality. *Aquaculture*, 414–415: 318–327.
- Mylonas, C. C., Papandroulakis, N., Smboukis, A., Papadaki, M., Divanach, P., 2004. Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerili*) using GnRHa implants. *Aquaculture*, 237: 141–154.
- Palermo-Neto, J., 1998. Anabolizantes e Pecuária de Corte. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP*, São Paulo, fascículo 1, 1: 010-015.
- Pandian, T.J., Sheela, S.G., 1995. Review: Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, 138: 1-22.

- Park, I., Kim, J., Cho, S. H., Kim, D. S., 2004. Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson). *Aquaculture*, 232: 183–193.
- Partsch, C. J., Sippell, W. G., 2001. Pathogenesis and epidemiology of precocious puberty. Effects of exogenous oestrogens. *Hum Reprod Update*, 7(3): 292–302.
- Passini, G., 2013. Indução da inversão sexual de machos do rabalo-flecha, *Centropomus undecimalis*, com implantes do hormônio 17β -estradiol. 47f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrária, Florianópolis – SC.
- Piferrer, F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197: 229–281.
- Rasines, I., Gómez, M., Martín, I., Rodríguez, C., Mañanós, E., Chereguini, O., 2013. Artificial fertilisation of cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Effects of the time of day of hormonal treatment on inducing ovulation. *Aquaculture*, 392–395: 94–97.
- Reis Filho, R. W., Araújo, J. C. de, Vieira, E. M., 2006. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. *Quim. Nova*, 29(4): 817–822.
- Rothbard, S.; Zohar, Y.; Zmora, N.; Sivan, B. L.; Moav, B.; Yaron, Z., 1990. Clearance of 17 α -ethynyltestosterone from muscle of sex-inversed tilapia hybrids treated for growth enhancement with two doses of the androgen. *Aquaculture*, Amsterdam, 89(3/4): 365–376.
- Shao, B., Zhao, R., Meng, J., Xue, Y., Wu, G., Hu, J., Tu, X., 2005. Simultaneous determination of residual hormonal chemicals in meat, kidney, liver tissues and milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 548: 41–50.
- Shi, Y., Peng, D., Shi, C., Zhang, X., Xie, Y., Lu, B., 2011. Selective determination of trace 17β -estradiol in dairy and meat samples by molecularly imprinted solid-phase extraction and HPLC. *Food Chemistry*, 126: 1916–1925.
- Singh, A. K., 2013. Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes *General and Comparative Endocrinology*, 181: 146–155.
- Specker, J. L., Chandless, M. K., 2003. Methodology for estradiol treatment in marine larval and juvenile fish: uptake and clearance in summer flounder. *Aquaculture*, Amsterdam, 217: 663–672.
- Sugumar, V., Munuswamy, N., 2006. Induction of population growth, mictic female production and body size by treatment of a synthetic GnRH analogue in the freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus* Pallas. *Aquaculture*, 258: 529–534.

- Szabó, T., Medgyasszay, C., Horváth, L., 2002. Ovulation induction in nase (*Chondrostoma nasus*, *Cyprinidae*) using pituitary extract or GnRH analogue combined with domperidone. *Aquaculture*, 203: 389–395.
- Tabata, Y. A., Rigolino, M. G., Tsukamoto, R. Y., 1999. Produção de lotes monossexos femininos triplóides de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Salmonidae). III - Crescimento até idade de primeira maturação sexual. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, 25 (único): 67-76.
- Taranger, G. L., Carrillo, M., Schulz, R. W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F. A., Dufour, S., Karlsen, O., Norberg, B., Andersson, E., Hansen, T., 2010. Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 483–515.
- Targońska, K., Kucharczyk, D., Kujawa, R., Mamcarz, A., Źarski, D., 2010. Controlled reproduction of asp, *Aspius aspius* (L.) using luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) analogues with dopamine inhibitors. *Aquaculture*, 306: 407–410.
- Toyama, G. N., Corrente, J. E.; Cyrino, J. E. P., 2000. Suplementação de vitamina C em rações para reversão sexual da tilápia do nilo. *Scientia Agricola*, 57(2): 221-228.
- Vazirzadeh, A., Amiri, B. M., Yelghi, S., Hajimoradloo, A., Nematollahi, M. A., Mylonas, C. C., 2011. Comparison of the effects of different methods of mammalian and salmon GnRHa administration on spawning performance in wild-caught female carp (*Cyprinus carpio carpio*) from the Caspian Sea. *Aquaculture*, 320: 123–128.
- Venturieri, R., Bernardino, G., 1999. Hormônios na reprodução artificial de peixes. *Panorama da Aqüicultura*, 09(55): 39-48.
- Verbinnen, R. F., Nunes, G. S., Vieira, E. M., 2010. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. *Quim. Nova*, 33(9): 1837-1842.
- Wang, H., Zhou, X., Zhang, Y., Chen, H., Li, G., Xu, Y., Zhao, Q., Song, W., Jin, H., Ding, L., 2012. Dynamic Microwave-Assisted Extraction Coupled with Salting-Out Liquid-Liquid Extraction for Determination of Steroid Hormones in Fish Tissues. *Agric. Food Chem.*, 60: 10343–10351.
- Wang, Q., Zhang, A., Pan, X., Chen, L., 2010. Simultaneous determination of sex hormones in egg products by ZnCl₂ depositing lipid, solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 678: 108–116.
- Wang, Y., Hu, M., Wang, W., Liu, X., Cheung, S. G., Shin, P. K. S., Song, L., 2009. Effects of GnRHa (D-Ala6, Pro9-NEt) combined with domperidone on ovulation induction in wild loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture*, 291: 136–139.

- Xu, C. L., Chu, X. G., Peng, C. F., Jin, Z. Y., Wang, L. Y., 2006. Development of a faster determination of 10 anabolic steroids residues in animal muscle tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 616–621.
- Yang, Y., Shao, B., Zhang, J., Wu, Y., Duan, H., 2009. Determination of the residues of 50 anabolic hormones in muscle, milk and liver by very-high-pressure liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877: 489–496.
- Ying, G., Kookana, R. S., Ru, Y., 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*, 28: 545– 551.
- Zanardi, M. F., 2007. Determinação de resíduo hormonal na carcaça de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) após reversão sexual. 87f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da UNESP Campus de Jaboticabal - CAUNESP, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- Zanardi, M. F., Koberstein, T. C. R. D., Urbinati, E. C., Fagundes, M., Santos, M. A. dos, Mataqueiro, M. I., 2011. Concentrações de hormônio na carcaça de tilápias-do-nilo e maturação precoce após reversão sexual. *R. Bras. Zootec.*, 40(1): 7-11.
- Zanoni, M. A., Leal, T. V., Filho, M. C., Oliveira, C. A. L. de, Ribeiro, R. P., 2013. Inversão sexual de alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade Supreme, submetidos a diferentes temperaturas durante fase de diferenciação sexual. *Ciências Agrárias, Londrina*, 34(1): 455-466.
- Zhou, J. L., Zhang, Z., 2011. Capítulo 9: Analysis of Hormones in Food. *Analysis of Endocrine Disrupting Compounds in Food*, Blackwell Publishing, Ltd. p.243-254.
- Zohar, Y., Mylonas, C. C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99–136.

**CAPÍTULO 2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO DE 17 β -ESTRADIOL EM
MÚSCULO DE TAMBAQUI POR LC-MS/MS**

Celia A. Hoga; Fernanda L. Almeida; Karine V. G. Reche; Vanessa R. Reis;
Felix G. R. Reyes

(A ser submetido para a revista Journal of the Brazilian Chemical Society)

RESUMO

Tambaqui (*Colossomamacropomum*) é uma das principais espécies de peixes nativas cultivadas no Brasil, na região da Amazônica. Destaca-se dentre as espécies com potencial produtivo, sendo a preferida dos amazonenses. O 17β -estradiol, hormônio com atividade estrogênica, vem sendo estudado para a formação de população monossexo de fêmeas, a qual apresenta maior taxa de crescimento do que o macho. Todavia, esse hormônio pode induzir alterações no sistema endócrino, gerando efeitos adversos à saúde do consumidor e/ou de seus descendentes. Assim, para avaliar se na carne do peixe, que recebeu tratamento de 17β -estradiol, apresenta resíduo de hormônio que possa oferecer risco à saúde humana, foi desenvolvido e validado método analítico para a determinação de resíduo de 17β -estradiol no músculo de tambaqui, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS). A avaliação de desempenho do método analítico indicou estar em conformidade com os limites e critérios descritos nos guias utilizados no presente estudo (657/2002/EC; MAPA/BRASIL, 2011). Cabe destacar que o método apresentou limite de detecção de $0,3 \text{ ng.g}^{-1}$ e de quantificação de $1,0 \text{ ng.g}^{-1}$, sendo que as amostras de músculo do tambaqui tratado não apresentaram resíduos detectáveis do hormônio. Assim, pode-se concluir que a carne do peixe tratado com 17β -estradiol, através da dieta, para fins de reversão sexual, não representa risco à saúde humana decorrente da presença de resíduos desse hormônio.

Palavras Chave: 17β -estradiol, tambaqui, LC-MS/MS, validação analítica.

ABSTRACT

Tambaqui (*Colossomamacropomum*) is one of the main species of native fish cultivated in Brazil, in the Amazon region. It stands out among the species with productive potential, being preferred by the Amazonians. The 17β -estradiol, hormone with estrogenic activity, has been studied for the formation of a female monosex population, which present a higher growth rate than the male. However, this hormone can induce changes in the endocrine system, causing adverse effects on consumer health and / or their descendants. Thus, to assess whether the fish meat, which has been treated with 17β -estradiol, presents a hormone residue that could offer a risk to human health, it was developed and validated an analytical method for the determination of 17β -estradiol residues in the tambaqui muscle, using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The performance evaluation of the analytical method indicated that it complied with the limits and criteria described in the guides used in the present study (657/2002/EC; MAPA/BRASIL, 2011). It should be noted that the method showed a detection limit of 0.3 ng.g^{-1} and a quantification limit of 1.0 ng.g^{-1} , being that the muscle samples of the treated tambaqui did not show detectable residues of the hormone. Thus, it can be concluded that the meat of the fish treated with 17β -estradiol, through the diet, for the purpose of sexual reversion, do not represent a risk to human health, as a consequence of residues of this hormone.

Keyword: 17β -estradiol, tambaqui, LC-MS/MS, analytical validation.

1. INTRODUÇÃO

O tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) é uma das principais espécies de peixes nativas cultivadas no Brasil, na região da Amazônia, e a sua carne é muito apreciada, sendo a preferida dos amazonenses. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (BRASIL, 2015b), o tambaqui, peixe nativo, é a segunda maior produção de pescado no Brasil e a primeira na região norte do país, enquanto que a tilápia, peixe exótico, é a maior produção de pescado no Brasil. Devido às características biológicas como crescimento rápido, grande porte, alta tolerância a baixas concentrações de oxigênio, resistente a doenças, onívoro, rústico, fácil aceitação às rações artificiais e boa adaptação a diferentes sistemas de criação (MEROLA e PAGÁN-FONT, 1988; SANTOS *et al.*, 2010; HANCZ, 1993), o tambaqui demonstra um alto valor comercial e grande importância para a economia regional (SANTOS *et al.*, 2010).

Graças ao crescimento da população, a demanda pelo pescado também vem aumentando, pois muitos consumidores buscam por alimentos saudáveis todos os dias. Portanto, a aquicultura no Brasil vem crescendo fortemente. Esse crescimento na produção de pescado se deve aos variados sistemas de criação, os quais tem o propósito de atender a demanda mundial de pescado, buscando também a sustentabilidade econômica e ambiental.

O uso de hormônio na aquicultura tem como objetivo principal induzir a formação de ovários ou testículos; em outras palavras, transformar os machos em fêmeas ou as fêmeas em machos. Quando os peixes nascem, eles já têm o sexo genético definido, mas não tem ainda o sexo fenotípico formado. De uma forma simplificada, são peixes com gônadas indiferenciadas (não são ovários e nem testículos ainda). No caso do tambaqui é induzida a formação de ovário no macho (o sexo genético não tem como ser alterado), pois estudos mostram que a fêmea apresenta maior taxa de ganho de peso corpóreo do que o macho. Esse fato ocorre devido à maturação sexual da fêmea ser mais tardio, pois os machos apresentam desenvolvimento de testículos aos 5 meses de idade enquanto que as fêmeas começam o desenvolvimento ovariano aos 12 meses. Essa diferença em que um dos sexos é superior em taxa de crescimento, ou ganho de peso, é comum em peixes teleósteos e ocorre, geralmente, na época

de incidência da puberdade de machos e fêmeas (ALMEIDA, 2013; IZEL *et al.*, 2013).

No Brasil, não há legislação que permita ou proíba o uso de 17β -estradiol para indução sexual fenotípica em peixes. Todavia, segundo a Portaria 51/91, é proibido o uso de substâncias naturais ou artificiais com atividade anabolizante, de caráter hormonal ou não, para fins de crescimento e ganho de peso dos animais de abate (BRASIL, 1991). Conforme a Regulação Nº 37/2010 da Comissão Europeia, o uso do 17β -estradiol é permitido apenas para propósitos terapêuticos e zootécnicos, não sendo requerido LMR (limite máximo de resíduo). No Codex Alimentarius - CAC/MRL N.º 02/2015 - o estabelecimento de LMR foi considerado desnecessário, pois o resíduo resultante da utilização desta substância como promotor de crescimento, em conformidade com as boas práticas pecuárias, não é susceptível de constituir um perigo para a saúde humana. Mas, em 1999, foi definido valor de IDA (ingestão diária aceitável) de $0-0,05 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corpóreo.

Para o meio ambiente os hormônios são considerados como contaminantes persistentes, pois eles são continuamente introduzidos através da urina e fezes excretados por humanos, os quais seguem para a rede coletora, culminando em rios e lagos. Apesar de encontrar na matriz ambiental uma concentração muito baixa de hormônio, na ordem de ng.L^{-1} (REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006), esses compostos podem induzir respostas estrogênicas em seres aquáticos, como por exemplo a mudança de sexo. Também os resíduos de hormônios presentes nos alimentos de origem animal podem trazer sérios problemas à saúde pública, tais como aparecimento de distúrbios endócrinos: indução de puberdade precoce, avanços na idade óssea com repercussões negativas no crescimento, modificação dos caracteres sexuais, problemas de desenvolvimento sexual prematuro, cistos ovarianos e indução de câncer (DUARTE; SILVA; MEIRELLES, 2002; CARDOSO *et al.*, 1999).

Atualmente, grande parte dos aspectos relacionados à segurança alimentar visa o controle de resíduos nos alimentos, em decorrência do uso de agrotóxicos, medicamentos veterinários ou de acidentes envolvendo contaminantes ambientais. No Brasil esse controle é executado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2016) através do

Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, que tem o objetivo de avaliar os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos de origem vegetal que chegam à mesa do consumidor. E, também, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1999) através do Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCRC, que tem como objetivo garantir a qualidade do sistema de produção de alimentos de origem animal ao longo das cadeias produtivas.

Os métodos analíticos para determinação qualitativa de resíduos de hormônios são por radioimunoensaio (RIA) e método imunoenzimático (ELISA). O método frequentemente usado para determinação quantitativa é a cromatografia líquida (ZANARDI, 2007) juntamente com vários tipos de detectores (eletroquímico, fluorescência, UV-Vis, DAD, espectrometria de massas (MS) e espectrometria de massas em tandem (MS / MS)) (REIS FILHO *et al.*, 2006). A cromatografia gasosa acoplada a detectores por espectrometria de massas (CG-EM) é, também, uma ferramenta que tem sido utilizada para a determinação de esteroides anabolizantes em geral (ZANARDI, 2007), porém, a preparação da amostra é trabalhosa e demorada.

Para toda análise cromatográfica é necessária a etapa de preparação da amostra para melhorar a detectabilidade dos analitos de interesse. Vários métodos de extração e *clean up* têm sido propostos para a preparação de amostras para determinação de hormônios em peixe, como a extração líquido-líquido (ROTHBARD *et al.*, 1990; XU *et al.*, 2006), extração em fase sólida molecularmente impresso (JIANG *et al.*, 2009), microextração de fibra em fase sólida revestido por polímero molecularmente impresso (HU *et al.*, 2010), extração assistida por microondas dinâmica acoplado com extração salting-out líquido-líquido (WANG *et al.*, 2012), extração de líquido pressurizado e QuEChERS (JAKIMSKA *et al.*, 2013), a qual tem sido largamente utilizada para determinar resíduos de contaminantes em matriz alimentar, apresentando no seu procedimento uma etapa de *clean up* (utilizando C18 e/ou PSA) ajudando na remoção de interferentes e minimizando o efeito matriz.

As técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas em tandem são muito empregadas para detecção e quantificação de fármacos veterinários e resíduos de contaminantes em diversas matrizes alimentares. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar metodologia analítica

para determinação de resíduo de 17β -estradiol no músculo de tambaqui, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (HPLC-MS/MS), e a aplicação do método validado na quantificação de resíduos de 17β -estradiol em músculo de tambaqui tratado com esse hormônio.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar método analítico para determinação de resíduo de 17β -estradiol em músculo de tambaqui por LC-MS/MS, e a aplicação do método validado na quantificação de seus resíduos em músculo de tambaqui tratado com esse hormônio.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver procedimento de extração do 17β -estradiol do músculo de tambaqui, utilizando o método QuEChERS;
- Desenvolver e validar método analítico através da técnica LC-MS/MS para a quantificação de resíduos de 17β -estradiol no músculo de tambaqui;
- Aplicar o método validado na quantificação de resíduos de 17β -estradiol em amostras de músculo de tambaqui tratado com esse hormônio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Solventes e reagentes

Padrão analítico de 17β -estradiol (pureza 100 %) obtido da RIVM - research of man and environment reference standard - contendo 0,1mg. Padrão interno 17β -estradiol- d_3 obtido da EU Community Reference Laboratory Bank of Reference Standards - EU/CRL: 54 - contendo 0,1mg. Os solventes orgânicos Acetonitrila (ACN), marca J.T.Baker (Xalostoc, México) e Metanol (MeOH), marca AppliChem Panreac (Barcelona, Espanha), ambos grau HPLC, foram utilizados para preparo de fase móvel e como diluente, respectivamente. Hidróxido de amônia (NH_4OH), marca Merck (Rio de Janeiro, Brasil), foi utilizado para o preparo de fase móvel e os reagentes sulfato de magnésio anidro P.A. (MgSO_4), marca Êxodo Científica (Hortolândia, Brasil), cloreto de sódio (NaCl) P.A., marca Panreac (Barcelona, Espanha), amina primária e secundária (PSA), marca Agilent Technologies (Santa Clara, USA), de tamanho de partícula de $40\mu\text{m}$, foram utilizados no preparo de amostra para extração dos resíduos de 17β -estradiol e no *clean up* dos extratos. Água ultrapura foi obtida através de um sistema Milli-QPlus system (Millipore, Bedford, MA, EUA).

3.1.2. Padrões e soluções

Solução padrão estoque – Foram preparadas soluções de 17β -estradiol em metanol na concentração de $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ e de 17β -estradiol- d_3 em metanol na concentração de 1000 ng.mL^{-1} . As soluções foram armazenadas em tubos de vidro âmbar com tampa de rosca e mantidas em freezer a temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por, até, 4 meses.

Solução padrão intermediária – Foi preparada pela diluição da solução de 17β -estradiol estoque com acetonitrila na concentração de 1000 ng.mL^{-1} e 50 ng.mL^{-1} e também pela diluição da solução de 17β -estradiol- $d3$ estoque com acetonitrila na concentração de 500 ng.mL^{-1} . As soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e mantidas em freezer a temperatura de -20°C por, até, 4 meses.

3.1.3. Equipamentos

As determinações de resíduos de 17β -estradiol foram realizadas utilizando um sistema Agilent UHPLC 1290 composto por bombas quaternárias, injetor automático, termostato para coluna e para amostrador. O espectrômetro de massas utilizado foi um triplo quadrupolo Agilent modelo 6460 (Agilent Technologies, CA, USA) usando fonte de ESI (Electrospray Ionization) no modo negativo. O software utilizado para a aquisição e tratamento dos dados foi o MassHunter versão B.06.00.

3.2. MÉTODO

3.2.1. Obtenção das amostras

O tratamento hormonal para a formação da população monossexo de fêmea de tambaqui, a partir da incorporação de 17β -estradiol na ração, foi realizado na Embrapa Amazônia Ocidental.

O tratamento foi iniciado quando os peixes atingiram a fase pós-larva (em média $1,48 \pm 0,25$ cm de comprimento, $0,067$ g de peso corpóreo). As larvas foram distribuídas em 5 tanques experimentais de polietileno em uma densidade de 100 larvas/200L, e alimentadas, durante 6 semanas, com ração (triturada e peneirada atingindo um tamanho de aproximadamente $0,5$ mm) contendo, para cada tanque, diferentes concentrações do hormônio (0, 20, 40, 80 e 120 mg.kg^{-1} de ração). Após esse período, os peixes foram alimentados com ração comercial (Nutripiscis AL 45 extrusada para alevinos, 45% de

proteína bruta) até completarem sete meses. Após essa etapa foi realizada a coleta das amostras (músculo) para determinação dos resíduos do hormônio (REIS, 2015). O resumo do tratamento hormonal para o tambaqui e as médias das medidas (comprimento e peso total) dos peixes de cada tanque, antes da coleta, está descritos na Figura 1.

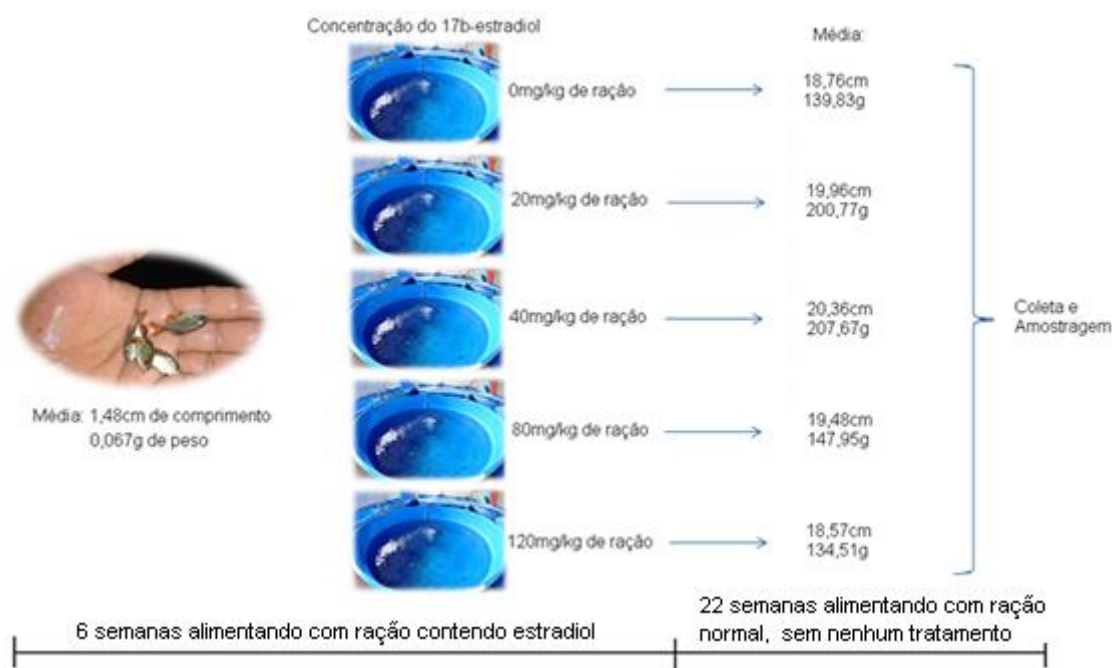


Figura 1 - Fluxograma do tratamento hormonal.

As amostras de músculos provenientes de peixes tratados (peixes alimentados com ração contendo 17 β -estradiol) e amostras de músculos brancos (peixes alimentados com ração sem 17 β -estradiol) foram mantidas a -20°C até serem analisadas por LC-MS/MS, utilizando o método analítico que foi desenvolvido e validado para tal propósito.

3.2.2. Preparo das amostras

Para a extração do resíduo de 17 β -estradiol do músculo de tambaqui, foi utilizada a técnica de extração conhecida como QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) que tem como vantagens ser rápida, de fácil manipulação, econômica, efetiva, robusta e segura, explorando as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna. Esse método se baseia na extração dos analitos com a ajuda de sais (sulfato de magnésio e

cloreto de sódio e/ou acetato de sódio) e agentes tamponantes (citrato de sódio) para induzir a transferência dos analitos para a fase orgânica, melhorando assim o rendimento das extrações (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Em seguida, um processo de *clean up* dos extratos foi realizado através da extração dispersiva em fase sólida (dSPE) para retirada de interferentes, tais como açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmentos presentes na matriz. Nessa etapa foram feitos testes com as amostras fortificados na concentração de 1ng.g^{-1} com diferentes adsorventes (PSA e C18) e também sem nenhum adsorvente, ou seja, utilizando-se apenas MgSO_4 , para comparar os sinais obtidos no detector e verificar a melhor opção de adsorvente a ser utilizado.

No procedimento de extração foram pesadas, em tubos de polipropileno de 50mL, 5,00g de amostras previamente trituradas e homogenizadas de músculo de tambaqui. As mesmas foram fortificadas com 0,2mL de padrão interno (500 ng.mL^{-1}) e, em seguida, 8mL de ACN foram adicionados, seguido de agitação em vórtex por 1 min. Logo após foi acrescentado 2g de MgSO_4 e 0,75g de NaCl, e levado à agitação em vórtex por 1 min seguido de centrifugação a $2500g$, por 10 min, à 20°C . Para a etapa do *clean up*, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno de 15mL. Foi adicionado 1g de MgSO_4 e 0,2g de PSA, e novamente agitado em vórtex por 1min e centrifugado a $2500g$, por 10 min, à 20°C . O sobrenadante foi transferido para tubo de vidro e colocado no concentrador, que é constituído de banho-maria a 60°C com sistema de injeção de nitrogênio, até secagem total. O resíduo foi ressuspendido em 0,25mL de ACN, filtrado em filtro de seringa PTFE hidrofóbico com poro de $0,22\mu\text{m}$, colocado no vial insert e injetado no UHPLC-MS/MS para análise. A marcha analítica do preparo da amostra está descrita na Figura 2.



Figura 2 - Fluxograma de preparo de amostra.

3.2.3. Preparo das curvas analíticas

Foram preparadas curvas analíticas de 17β -estradiol em solvente, no extrato e na matriz, nas seguintes concentrações: 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 ng.g^{-1} . A curva na matriz foi preparada realizando as fortificações na amostra branca no início do método, junto com o padrão interno, e na curva no extrato as fortificações foram feitas após a secagem do extrato da amostra branca. Logo em seguida secou-se novamente para ressuspender em 0,25mL de ACN.

3.2.4. Desenvolvimento do método analítico por LC-MS/MS

A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna analítica de fase reversa Poroshel EC-18 (150 x 2,1mm, 2,7 μm) (Agilent Technologies). A coluna foi mantida a temperatura ambiente (25°C) e o volume das injeções foi de 8 μL . A fase móvel empregada foi uma mistura de ACN com 0,01 % de NH_4OH (A) e H_2O com 0,01 % de NH_4OH (B). A proporção entre as fases A:B foi de 60:40 v/v (modo isocrático, por ser uma corrida de apenas um analito), com um fluxo de 0,350 mL.min^{-1} . A fase móvel A foi filtrada na membrana

hidrofóbica de PTFE com poro de 0,22µm e diâmetro de 47mm (Millipore, São Paulo, Brasil), e a fase móvel B foi filtrada em membrana hidrofílica PVDF com poro de 0,22µm e diâmetro de 47mm (Millipore, São Paulo, Brasil).

A otimização dos parâmetros da fonte de ionização, como fluxo de gás de dessolvatação, temperatura do gás de dessolvatação, voltagem do capilar, voltagem do extrator de íons, fluxo do gás de colisão e energia de colisão foram estabelecidos, conforme apresentado na Tabela 1.

A determinação dos resíduos de 17β-estradiol foi realizada em modo MRM (Multiple Reaction Monitoring), tendo sido monitoradas duas transições: a transição m/z 271,2→145,0 relacionada ao íon quantificador e a transição m/z 271,2→183,0 relacionada ao íon qualificador, com objetivo de se obter 3 pontos de identificação, conforme preconizado pelo Guia da Comunidade Europeia 2002/657/CE, directiva 96/23/CE. Para o padrão interno 17β-estradiol-*d*3 foi monitorado a transição m/z 274,2→145,0.

Tabela 1 - Parâmetros utilizados no espectrômetro de massas.

Parâmetros	
Temperatura de gás	400°C
Fluxo de gás	12 L.min ⁻¹
Nebulizador	50 psi
Temperatura de gás da bainha	300°C
Fluxo de gás da bainha	10 L.min ⁻¹
Voltagem do capilar	4000 v
Voltagem da agulha	300 v

3.2.5. Validação do método analítico

A validação foi realizada considerando os guias oficiais da União Europeia (EC, 2002), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (BRASIL, 2011), da Conferência Internacional sobre Harmonização Veterinária (VICH, 2011) e da Resolução 06/2004, da SENASA. Os parâmetros de validação considerados foram: seletividade/especificidade, linearidade,

sensibilidade, repetibilidade, reprodutibilidade, exatidão/recuperação, robustez, limites de detecção (LOD), de quantificação (LOQ) e de decisão ($CC\alpha$), e capacidade de detecção ($CC\beta$).

A verificação da seletividade do procedimento analítico deve ser realizada a partir da comparação entre os sinais (resposta instrumental) advindos do processamento da matriz branco, do extrato da matriz branca fortificada e do analito puro em solvente. A seletividade do método foi avaliada pela análise de seis amostras de músculo branco, verificando-se nos cromatogramas a presença ou ausência de compostos eluindo no tempo de retenção do analito, ou próximo dele. A linearidade e a sensibilidade foram estabelecidas a partir das curvas analíticas em solução padrão, extrato fortificado e matriz fortificada em 5 níveis de concentração (1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 ng.g^{-1}). Os resultados obtidos foram analisados pelo método de mínimos quadrados e a linearidade expressa como o coeficiente de correlação linear (r), enquanto que a sensibilidade foi avaliada pela inclinação das curvas analíticas no solvente, extrato e na matriz fortificada.

A avaliação do efeito matriz é destinada a verificar as interferências causadas por quaisquer elementos que componham a matriz de amostragem, o que poderia gerar diminuição ou aumento de sinal no espectrômetro de massas. Utilizando os dados obtidos na curva analítica em solvente e no extrato obtido da matriz branco e fortificado, aplicou-se o teste F (Fischer-Snedecor), de homogeneidade de variâncias, para verificar se as variâncias das amostras não matrizadas e matrizadas podem ser consideradas estatisticamente iguais ou não, em cada nível de fortificação. Para aceitação da não existência de efeito matriz, não deve haver efeito matriz em nenhum nível de concentração das fortificações. Aplicou-se, também, o teste t (Student) para verificar se as médias dos resultados de dois métodos (F_{tabelado} e $F_{\text{calculado}}$) podem ser consideradas estatisticamente iguais ou não.

A precisão do método foi determinada em duas etapas: por repetibilidade (intradia) e pela reprodutibilidade (interdia). A precisão foi avaliada em 3 níveis de concentração baixos da faixa de trabalho, 1; 5 e 10 ng.g^{-1} , por ser um analito considerado proibido. A repetibilidade foi expressa pelo coeficiente de variação (CV %) dos resultados de 6 replicatas em todos os níveis de fortificação, analisados no mesmo dia, com a mesma amostra e

usando o mesmo instrumento. A reprodutibilidade foi expressa pelo CV % dos resultados de 6 replicatas, em todos os níveis de fortificação, das análises realizadas em três dias diferentes ($n = 3$), pelo mesmo analista, usando a mesma amostra e o mesmo instrumento.

A recuperação tem por objetivo corrigir o resultado da análise dos erros sistemáticos oriundos dos efeitos de extração ou digestão e das perdas advindas de todas as etapas da marcha analítica, realizadas até a leitura da resposta instrumental, tais como limpeza (*clean up*), diluições ou pré-concentração, derivatizações e secagens. O procedimento analítico deve ser capaz de recuperar, em cada nível de fortificação, de 70 % a 120 % em média, com uma precisão de $CV \leq 20$ %. A recuperação foi determinada através da fortificação da matriz branca, 6 replicatas, em 3 níveis de concentração, 1; 5 e 10 $ng.g^{-1}$. Após analisar a amostra foi obtida a concentração presente em cada amostra, a partir desses dados foi realizado o cálculo da recuperação em cada amostra seguindo a equação ($\% \text{ Recuperação} = 100 \times \text{teor medido/nível de fortificação}$) da Guia da Comunidade Europeia 2002/657/CE. Obtendo os valores da recuperação calculou-se a média e o CV % das 6 replicatas de cada nível.

O estudo de robustez é feito pela variação nas condições experimentais do procedimento analítico para verificar se tem efeito significativo sobre a qualidade metrológica do resultado analítico. Os testes de robustez foram realizados em amostras branco de músculo de tambaqui fortificado com 17 β -estradiol na concentração de 10 $ng.g^{-1}$, em duplicata, modificando alguns parâmetros na etapa do preparo de amostra, tais como: diminuição da quantidade de $MgSO_4$ para 1 g (A); Diminuição da quantidade de NaCl para 0,5 g (B); Diminuição da quantidade de PSA para 50 mg (C); Aumento da quantidade de ACN para 12 mL (D); Aumento do tempo de agitação na etapa da partição para 2 min (E); Aumento da temperatura da centrifuga para 25 °C (F); e aumento da temperatura de banho maria para 65 °C (G). Foi utilizado o procedimento de Youden e Steiner para avaliar a robustez, conforme descrito na Resolução 06/2004, da SENASA.

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram avaliados conforme a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA (BRASIL, 2003), utilizando-se as Equações 1 e 2:

$$LOD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (2)$$

Nas equações, o *DPa* é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas, contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação. O *IC* é a inclinação da curva de calibração.

O cálculo teórico do limite de decisão ($CC\alpha$) e da capacidade de detecção ($CC\beta$) foi obtido conforme recomendado pelo MAPA (BRASIL, 2011) usando as Equações 3 e 4, que são para substâncias proibidas:

$$CC\alpha = 2,33 \times \delta \quad (3)$$

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times \delta \quad (4)$$

Nas equações o δ correspondem ao desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial no LMDR. Esses parâmetros medem o desempenho do procedimento analítico, levando em consideração a incerteza da medição no nível de interesse.

3.2.6. Verificação de 17β -estradiol no músculo de tambaqui tratado

Através do método analítico previamente validado, foram realizadas as análises das amostras (músculo) de tambaqui tratadas e não tratadas, oriundas dos ensaios de campo realizados na Embrapa Amazônia Ocidental, para verificar a presença de resíduos 17β -estradiol. Não sendo detectada a presença do 17β -estradiol, o peixe estará livre de resíduos hormonais e, consequentemente, apto para o consumo humano.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Na etapa de *clean up* das amostras foram feitos testes com diferentes adsorventes (PSA e C18) e também sem nenhum adsorvente, ou seja, utilizando-se apenas MgSO_4 . Utilizando-se MgSO_4 sem adsorvente ou MgSO_4 + C18, o sinal analítico do 17β -estradiol sofreu supressão, não sendo possível quantificá-lo (Figura 3A e 3B). O melhor resultado de recuperação foi obtido quando se utilizou uma mistura de MgSO_4 + PSA (Figura 3C), tendo sido adotada no método analítico como etapa de *clean up*.

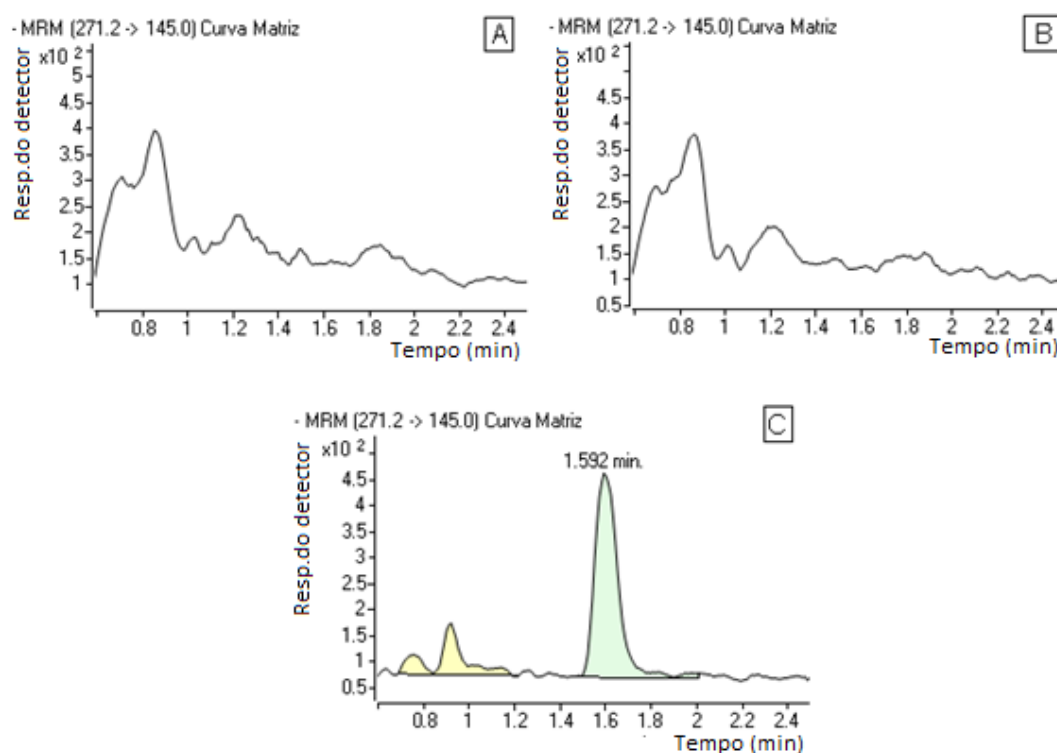


Figura 3 – Cromatogramas com diferentes *clean up* na concentração de 17β -estradiol de 1 ng.g^{-1} . O *clean up* foi feito com adição (A) apenas de MgSO_4 , (B) MgSO_4 e C18, e (C) MgSO_4 e PSA.

Segundo Bailey *et al.* (2007) a fragmentação da transição m/z 271,2→145,0 (mais abundante) do 17β -estradiol é apenas de 5 % em relação

ao íon precursor. A transição m/z 271,2→183,0 relacionada ao íon qualificador, não foi possível de ser verificada no ponto de 1 ng.g⁻¹ da curva analítica, devido à dificuldade de ionizar e fragmentar o 17 β -estradiol. Cabe mencionar que, conforme o manual de garantia da qualidade analítica do MAPA (BRASIL, 2011), para o método quantitativo de confirmação é requerido um mínimo de quatro pontos de identificação (1 íon precursor e 2 íons produtos) para a confirmação de substâncias proibidas. Assim, na validação, foi assumido o método quantitativo de triagem para o primeiro ponto (1 ng.g⁻¹) e o método quantitativo de confirmação para outros quatro pontos da curva analítica (5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 ng.g⁻¹), conforme estabelecido pelo Guia da Comunidade Europeia 2002/657/CE, directiva 96/23/CE (Quadro 1).

Quadro 1 - Classificação dos métodos analíticos com as características de desempenho que devem ser determinadas.

		Limite detecção CC β	Limite decisão CC α	Veracidade/ recuperação	Precisão	Seletividade/ especificidade	Aplicabilidade/ robustez/ estabilidade
Método qualitativo	T	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Método quantitativo	T	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

T = Método de triagem, C = Método de confirmação, + = A determinação é obrigatória

Fonte: Guia da Comunidade Europeia 2002/657/CE

Porém, apesar de ter sido assumido o método quantitativo de triagem para o primeiro ponto da curva analítica, o mesmo foi considerado na determinação dos parâmetros necessários para a validação do método quantitativo de confirmação, a saber: CC β (capacidade de detecção), CC α (limite de decisão), veracidade/recuperação, precisão (interdia e intradia), seletividade/especificidade e aplicabilidade/ robustez/estabilidade.

4.1.1. Especificidade e seletividade

A especificidade foi avaliada comparando o sinal analítico do padrão de 17 β -estradiol em solvente com os cromatogramas da matriz e do extrato

fortificado. Verificou-se que o sinal analítico do analito em questão aparece no tempo de retenção de 1,60min, com CV=0,85 % ($n \geq 20$). O CV da especificidade deve ser menor que 2,5 % (EC, 2002).

A verificação da seletividade do procedimento analítico também foi realizada a partir da comparação entre os cromatogramas da matriz branco, da matriz branca fortificada e do 17β -estradiol puro em solvente. Para o método ser considerado seletivo não deve haver presença de compostos, interferentes, eluindo no tempo de retenção do analito. Assim, o método pode ser considerado seletivo, pois não houve presença de interferentes coeluinto com o analito em questão (Figura 4).

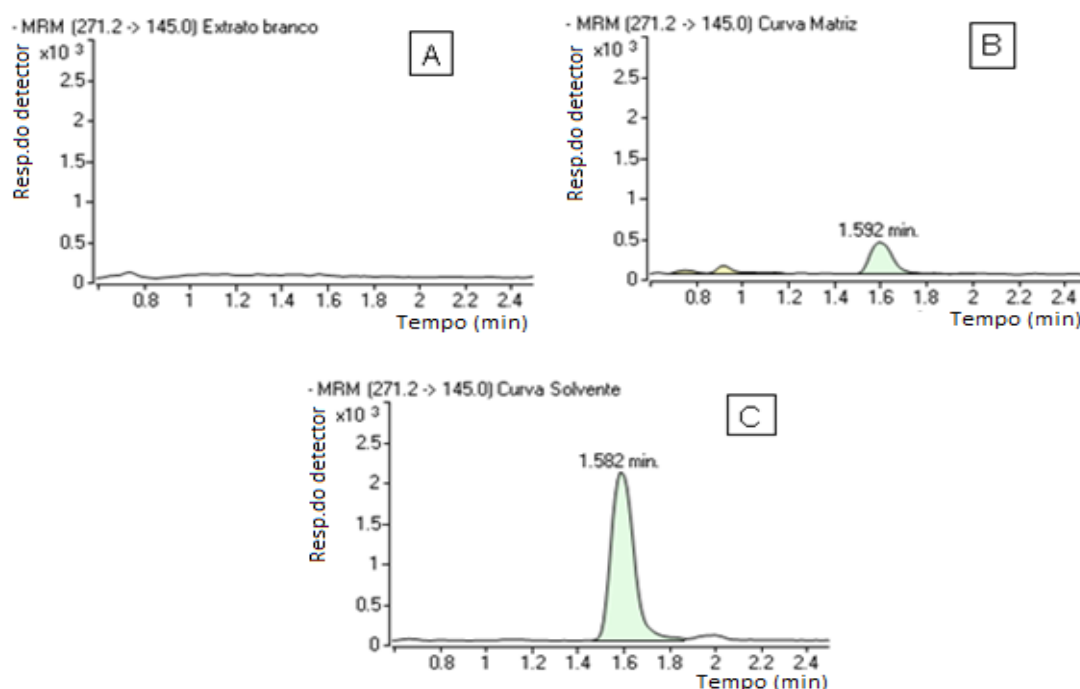


Figura 4 – Cromatogramas da A) matriz branca, da B) matriz branca fortificada e do C) 17β -estradiol puro em solvente, na concentração de 1 ng.g^{-1} .

4.1.2. Efeito Matriz

Para o estudo do efeito matriz utilizou-se o teste F, de homogeneidade de variâncias, para verificar se as variâncias das amostras não matrizadas (curva no solvente) e matrizadas (curva no extrato) podem ser consideradas estatisticamente iguais ou não, em todos os níveis de fortificação (BRASIL, 2011). Para cada nível de fortificação foram feitas 6 replicatas, sendo que se

$F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, considera-se a ocorrência de efeito matriz. Verificou-se que em três níveis de fortificação houve influência positiva da matriz (Tabela 2).

Tabela 2– Cálculo de F (Fischer-Snedecor) para avaliação do efeito matriz.

Nível de Concentração (ng.g ⁻¹)	F _{calculado}	F _{tabelado}	Influência da Matriz
1	1,10	5,05	Negativo
5	1,22	5,05	Negativo
10	9,98	5,05	Positivo
20	5,34	5,05	Positivo
40	8,62	5,05	Positivo

Assim, aplicou-se o teste t para verificar se as médias dos resultados dos dois métodos (F_{tabelado} e $F_{\text{calculado}}$) podem ser consideradas estatisticamente diferentes, ou não. Se $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$, considera-se a ocorrência de efeito matriz. Verificou-se que um nível de fortificação apresentou influência de efeito matriz (Tabela 3) e, assim, conforme o Guia de Validação adotado, o método analítico foi considerado sujeito a efeito matriz (BRASIL, 2011).

Tabela 3 – Cálculo de t (Student) para avaliação do efeito matriz.

Nível de Concentração (ng.g ⁻¹)	t _{calculado}	t _{tabelado}	Influência da Matriz
1	9,76	1,796	Positivo
5	2,89	1,796	Positivo
10	1,29	1,943	Negativo
20	1,68	1,895	Negativo
40	0,04	1,943	Negativo

4.1.3. Linearidade

O resultado do estudo da linearidade está apresentado na Figura 5, junto com a equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2) da curva matriz. O coeficiente de correlação linear (r) da curva foi de 0,9999, sendo que o critério

de aceitação é de $r > 0,98$ (INMETRO, 2003). Ou seja, a resposta do detector foi linear na faixa de trabalho ($1,0$ a $40,0 \text{ ng.g}^{-1}$) e, assim, a resposta relativa do detector foi proporcional à concentração do analito. A resposta relativa foi calculada como a razão da resposta do 17β -estradiol sobre a resposta do padrão interno (17β -estradiol- d_3), sendo a concentração expressa em ng.g^{-1} .

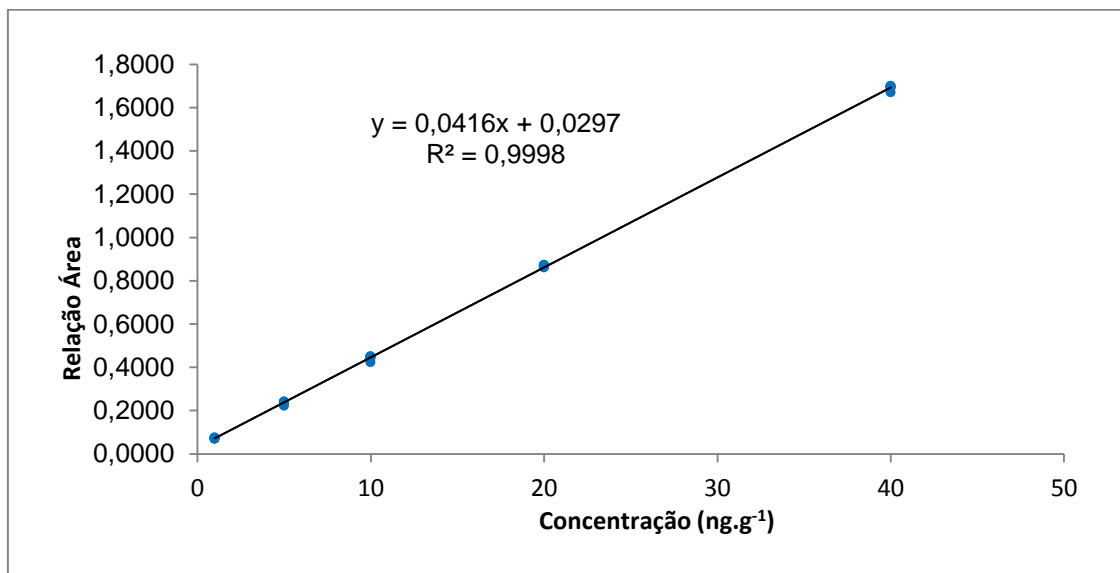


Figura 5 – Representação gráfica da curva de calibração do ensaio de 17β -estradiol.

4.1.4. Recuperação

Os níveis selecionados para o cálculo da recuperação foram os três primeiros pontos da curva matriz ($1,0$; $5,0$; e $10,0 \text{ ng.g}^{-1}$). Para cada nível de fortificação foram feitas 6 replicatas (Tabela 4).

Os critérios de aceitação do MAPA (BRASIL, 2011) indicam que o intervalo de recuperação aceitável para a concentração de 1 ng.g^{-1} , é entre 50 e 120 %; para 5 ng.g^{-1} , é entre 70 e 110 %; e para 10 ng.g^{-1} , é entre 80 e 110 %. Assim, os resultados da recuperação estão todos em conformidade com os critérios estabelecidos pelo Guia de Validação.

Tabela 4 – Resultados obtidos através do cálculo de recuperação.

Concentração de fortificação (ng.g⁻¹)	Recuperação (%)	Coefficiente de variação (%)
1,0	103,8	4,79
5,0	88,3	3,36
10,0	85,7	2,39

4.1.5. Repetibilidade e reprodutibilidade

Segundo a Guia da Comunidade Europeia (EC, 2002), os níveis selecionados para os cálculos da precisão são os três pontos equivalentes a 1, 1,5 e 2 vezes o LMDR. Nesse caso seriam os três primeiros pontos da curva analítica (1,0; 5,0 e 10,0 ng.g⁻¹). Para cada nível de fortificação foram feitas 6 replicatas em 3 dias diferentes, com o mesmo analista, para a repetibilidade, e 6 replicatas em 3 dias diferentes, com analista diferente, para a reprodutibilidade (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultados obtidos do cálculo da precisão do método analítico (repetibilidade e reprodutibilidade).

Concentração de fortificação (ng.g⁻¹)	Repetibilidade (CV %)	Reprodutibilidade (CV %)
1	2,61	1,53
5	2,90	1,21
10	1,43	0,66

Os critérios de aceitação da reprodutibilidade do MAPA (BRASIL, 2011) indicam que nas faixas de concentração (c): $1 \text{ ng.g}^{-1} \leq c < 10 \text{ ng.g}^{-1}$, o CV deve ser menor do que 30 % e para $10 \text{ ng.g}^{-1} \leq c < 100 \text{ ng.g}^{-1}$ o CV menor do que 20 %. O critério de aceitação da repetibilidade é o valor do CV da reprodutibilidade multiplicado por 2/3. Assim, os resultados obtidos para a precisão do método analítico estão em conformidade com os critérios de aceitação preconizados no Guia de Validação mencionado.

4.1.6. LOD, LOQ, CC α e CC β

Considera-se o 17 β -estradiol uma substância de uso proibido como promotor de crescimento (BRASIL, 1991; EC, 2010). Entretanto, não consta na legislação a proibição do uso dessa substância com a finalidade de indução hormonal em peixe e, também, não consta que seja permitida. Portanto, independente da sua finalidade, considera-se esse hormônio uma substância proibida. Além disso, não existe um valor de LMR ou de LMDR para essa substância em pescados (BRASIL, 2015a).

Os valores de LOD e LOQ estabelecidos para o método analítico foram de 0,3 ng.g⁻¹ e 1,0 ng.g⁻¹, respectivamente. Sendo que o valor de LOQ foi considerado como sendo o LMDR para os resíduos de 17 β -estradiol no músculo de tambaqui. Segundo a Instrução Normativa MAPA/SDA N° 11, de 07 de maio de 2014 (BRASIL, 2014), quando se tratar de substância proibida em determinada espécie, mas sem valor de LMDR estabelecido, o LMDR deverá ser menor do que 2 ng.g⁻¹. Portanto, o limite mínimo do método para verificar a presença de 17 β -estradiol (LOD), ou quantificar os seus resíduos (LOQ) em uma amostra a analisar, deveram ser menores do que 2 ng.g⁻¹. Assim, a confirmação do LOD foi realizada pela análise de 10 replicatas de amostras branco de músculo de tambaqui fortificado com 17 β -estradiol na concentração de 0,3 ng.g⁻¹, tendo-se verificado que o equipamento foi capaz de detectar o analito em questão, em todas as replicatas. O LOQ também foi verificado experimentalmente. Para tanto, foram analisadas 20 replicatas de amostras branco de músculo de tambaqui fortificado com 17 β -estradiol na concentração de 1,0 ng.g⁻¹, tendo-se verificado um valor de CV menor do que 2,98 %, o qual está em concordância com os Guias de Validação adotados (EC, 2002; Brasil, 2011). Para fins de comparação, na Figura 6 são apresentados os cromatogramas obtidos para o LOQ, LOD e o branco da matriz.

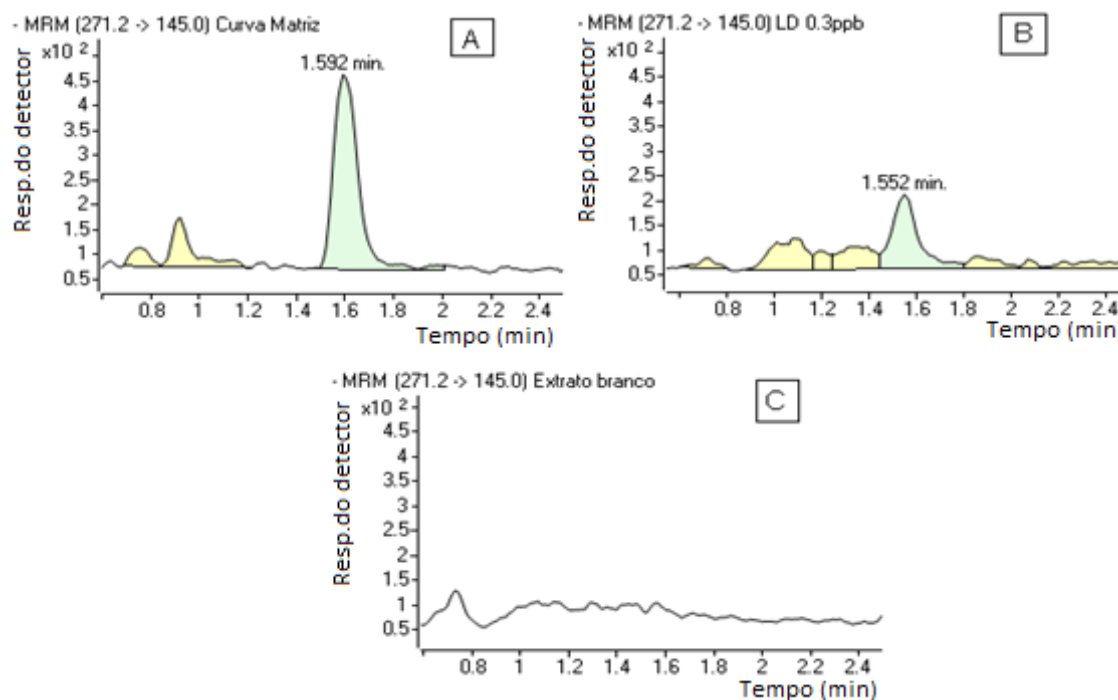


Figura 6 – Cromatogramas onde A) refere-se ao LOQ, B) LOD e C) branco da matriz.

Cabe ressaltar que, no caso do 17β -estradiol, por se tratar de uma substância proibida, considera-se que uma amostra terá resultado não conforme sempre que contiver esse hormônio. Assim, para essa substância é importante a elaboração de método de triagem (utilizado para detectar a presença de uma substância numa amostra a um nível requerido).

O limite de decisão ($CC\alpha$) (concentração crítica com erro α), e a capacidade de detecção ($CC\beta$) (concentração crítica com erro β), são dois parâmetros estatísticos que determinam a capacidade de um método em detectar e quantificar a presença de resíduos dos analitos pesquisados, tendo em conta a variabilidade do método e os erros estatísticos associados a resultados incorretos (EC, 2002).

O $CC\beta$ é o limite a partir do qual o analito pode ser detectado, identificado e/ou quantificado com uma probabilidade de erro β (erro de 5 % para todas as substâncias permitidas ou não). Na prática, o $CC\beta$ é importante em métodos de triagem, pois indica a capacidade de detecção de determinado composto com uma certeza de 95 %. Assim, as amostras que contenham resíduos com concentrações superiores a esta concentração, devem ser sujeitas a métodos de confirmação, de modo a verificar a conformidade das

mesmas. (Freitas *et al.*, 2012). No método desenvolvido o valor de $CC\beta$ calculado foi de $1,2 \text{ ng.g}^{-1}$.

O $CC\alpha$ é a concentração a partir da qual uma amostra pode ser declarada não conforme com uma probabilidade de erro igual a α (erro de 1 % para substâncias não permitidas ou proibidas, o qual é o caso dos resíduos de 17β -estradiol no músculo de tambaqui). Na prática o $CC\alpha$ é importante em métodos de confirmação, pois determina a concentração partir da qual se considera uma amostra não conforme. No método desenvolvido o valor calculado de $CC\alpha$ foi de $0,7 \text{ ng.g}^{-1}$.

Assim, conclui-se que os valores calculados de $CC\alpha$ e $CC\beta$ para os resíduos de 17β -estradiol no músculo de tambaqui refletem, de modo realista, a variabilidade do método e atendem a orientação de valor de LMDR (2 ng.g^{-1}) conforme estabelecido na Instrução Normativa MAPA/SDA N° 11, de 07 de maio de 2014 (BRASIL, 2014).

4.1.7. Robustez

Os valores obtidos para os parâmetros avaliados no teste de robustez do método são apresentados na Tabela 6. O procedimento analítico é considerado robusto quando as variações de cada parâmetro estudado não afetam significativamente o resultado da medição. Conforme a Resolução 06/2004 da SENASA esses valores tem que ser menores do que o valor de $DSx2^{1/2}$ (DS é o desvio padrão dos 8 resultados obtidos com as modificações dos parâmetros avaliados, mais o método de rotina), equivalente a 2,258, para que não afete o resultado final.

Comparando os resultados com o método de rotina, verificou-se que as modificações dos parâmetros não afetaram o resultado final. Portanto, o método desenvolvido pode ser considerado robusto em relação aos parâmetros modificados.

Tabela 6 – Resultados da avaliação de robustez.

Parâmetros	Efeito	Conclusão
A	1,187	A modificação do parâmetro não afeta o resultado final
B	-0,305	A modificação do parâmetro não afeta o resultado final
C	-0,775	A modificação do parâmetro não afeta o resultado final
D	-0,975	A modificação do parâmetro não afeta o resultado final
E	2,015	A modificação do parâmetro não afeta o resultado final
F	0,383	A modificação do parâmetro não afeta o resultado final
G	-1,288	A modificação do parâmetro não afeta o resultado final

Na Tabela 7 é apresentado um resumo dos resultados obtidos dos parâmetros de validação avaliados. Verificou-se que o método desenvolvido está em conformidade com os critérios de aceitação dos Guias de Validação adotados (EC, 2002; BRASIL, 2011) sendo, portanto, adequado para a determinação de resíduos de 17β -estradiol em músculo de tambaqui.

4.2. ANÁLISE DO MÚSCULO DE TAMBAQUI TRATADO COM 17β -ESTRADIOL

O método validado foi utilizado na análise de amostras de músculo de tambaqui provenientes de peixes tratados com diferentes doses de 17β -estradiol, coletadas sete meses após o tratamento hormonal (REIS, 2015). Não foi detectada a presença de resíduo de 17β -estradiol levando em consideração o LOD de $0,3 \text{ ng.g}^{-1}$ e o CC β de $1,2 \text{ ng.g}^{-1}$ estabelecidos para o método. Desta

Tabela 7 – Resumo dos resultados dos parâmetros avaliados em comparação com seus critérios de aceitação.

Parâmetro	Resultado Obtido	Critério	Avaliação
Especificidade	Tempo de retenção CV=0,85 %	CV<2,5 %	Conforme
Seletividade	Ausência de interferentes no tempo de retenção do analito.	Sinais <30 % do sinal do analito menor nível calibrado.	Conforme
Linearidade	R=0,9999	R>0,98	Conforme
Recuperação	Em 1 ng.g ⁻¹ , Rec=103,8 %	Entre 50 e 120 %	Conforme
	Em 5 ng.g ⁻¹ , Rec=88,3 %	Entre 70 e 110 %	Conforme
	Em 10 ng.g ⁻¹ , Rec=85,7 %	Entre 80 e 110 %	Conforme
Repetitividade	Em 1 ng.g ⁻¹ , CV=2,61 %	CV<20 %	Conforme
	Em 5 ng.g ⁻¹ , CV=2,90 %	CV<20 %	Conforme
	Em 10 ng.g ⁻¹ , CV=1,43 %	CV<13,33 %	Conforme
Reprodutibilidade	Em 1 ng.g ⁻¹ , CV=1,53 %	CV<30 %	Conforme
	Em 5 ng.g ⁻¹ , CV=1,21 %	CV<30 %	Conforme
	Em 10 ng.g ⁻¹ , CV=0,66 %	CV<20 %	Conforme

forma, não houve nenhuma amostra a ser quantificada quanto a presença de 17 β -estradiol. Segundo Piferrer (2001), o 17 β -estradiol por ser um hormônio natural é metabolizado em menos de um mês após o término do tratamento. Assim, é possível afirmar que o consumo de músculo de tambaqui, proveniente de alevinos alimentados durante 6 semanas, com ração para reversão sexual contendo até 120 mg de 17 β -estradiol por quilo de ração, não oferece risco à saúde dos consumidores em relação a presença de resíduos desse hormônio.

5. CONCLUSÃO

O método QuEChERS mostrou-se eficiente na etapa de preparo de amostra para a determinação de 17β -estradiol no músculo de tambaqui sendo que a avaliação do desempenho do método analítico desenvolvido indicou parâmetros de validação [especificidade, linearidade, seletividade, exatidão/recuperação, precisão, limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)] em conformidade com os limites e critérios descritos nos guias utilizados no presente estudo (EC, 2002; BRASIL, 2011). Além desses parâmetros, avaliou-se o efeito matriz, tendo também sido determinados os valores de limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), assim como a robustez do método. Conclui-se que o método apresentou características de desempenho que cumprem com os limites e critérios descritos na Decisão da Comissão 2002/657/CE e no MAPA (BRASIL, 2011).

Verificou-se que o método é adequado para determinar a presença e quantificar os resíduos do 17β -estradiol no músculo de tambaqui, em níveis de $0,3 \text{ ng.g}^{-1}$ (LOD) e $1,0 \text{ ng.g}^{-1}$ (LOQ), respectivamente. Sendo que, não foi verificada a presença de resíduos de 17β -estradiol em níveis acima do LOD (ou do $CC\beta$) em amostras de músculo de tambaqui tratado com o hormônio para fins de indução de sexo. Assim, pode-se concluir que o consumo de músculo de tambaqui, submetido a procedimento de indução do sexo feminino, para criar um lote uniforme e melhorar a taxa de crescimento dos peixes utilizando-se 17β -estradiol, não representa risco à saúde humana.

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. L. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, 37(2): 174-180, 2013.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction "for the Determination of Pesticide Residues in Produce. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 2003.

- BAILEY, J.; CARON, E.; CESSNA, A. J.; FARENHORST, A.; SHEEDY, C. Maximizing Sensitivity in the LC-MS/MS Determination of Estrone (E1), 17 β -Estradiol (E2), Estriol (E3) and 17 α -Ethinyl Estradiol in Natural Waters. Western Canada Trace Organics Workshop. Calgary, Alberta, 2007.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA): Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29 de Maio de 2003. Diário Oficial da União. Brasília, 2003.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA): Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>. Acesso em: 17/11/2016
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Instrução Normativa No42, de 20 de Dezembro de 1999. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 1999.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUARIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa SDA No11, de 7 de Maio de 2014. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 2014.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUARIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa SDA No13, de 15 de Julho de 2015. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 2015.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUARIA E ABASTECIMENTO. Manual de garantia da qualidade analítica. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria nº 51 de 24 de maio de 1991. Diário Oficial da União, Brasília. Seção I, p.9989, 1991.
- CARDOSO, O. M. C.; SILVA, T. J. P.; SANTOS, W. L. M. Ocorrência de resíduos de dietilestilbestrol e zeranól em fígado de bovinos abatidos no Brasil. Ciênc. Tecnol. Alim., Campinas, 19(3): 1001–1014, 1999.
- CODEX ALIMENTARIUS. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. CAC/MRL N.º 02/2015 de Julho/2015.
- COMMISSION DECISION (EC) 657/2002 of 12 August 2002 on implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of European Union, p. 8-36, 2002.
- COMMISSION REGULATION (EC) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Union, p. 50, 2010.

- DUARTE, K. M. R.; SILVA, F. M. S. M. da; MEIRELLES, C. F. Resíduos de anabolizantes na produção animal: Importância e métodos de detecção. *Cienc. Rural*, Santa Maria, 32(4): 731-737, 2002.
- FREITAS, A., BARBOSA, J., RAMOS, F. Avaliação do desempenho de métodos analíticos de pesquisa de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal: Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$). *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 2(1):83-88, 2012.
- HANCZ, C. Performance of the Amazonian Tambaqui, *Colossoma macropomum*, in Pond Polyculture. *Aquacultural Engineering*, 12: 245-254, 1993.
- HU, Y., WANG, Y., CHEN, X., HU, Y., LI, G. A novel molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber coupled with high performance liquid chromatography for analysis of trace estrogens in fishery samples. *Talanta*, 80: 2099–2105, 2010.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008 – Revisão 01, Rio de Janeiro, Março de 2003.
- IZEL, A. C. U.; CRESCÊNCIO, R.; O’SULLIVAN, F. F. L. de A.; CHAGAS, E. C.; BOIJINK, C. de L.; SILVA, J. I. Circular Técnica 39: Produção Intensiva de Tambaqui em Tanques Escavados com Aeração. Embrapa, Manaus, 2013.
- JAKIMSKA, A., HUERTA, B., BARGANSKA, Z., KOT-WASIK, A., RODRÍGUEZ-MOZAZ, S., BARCELÓ, D. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers. *Journal of Chromatography A*, 1306: 44–58, 2013.
- JIANG, T., ZHAO, L., CHU, B., FENG, Q., YAN, W., LIN, J. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of 17-estradiol in fishery samples with high performance liquid chromatography. *Talanta*, 78: 442–447, 2009.
- MEROLA, N.; PAGÁN-FONT, F. A. Pond Culture of the Amazon Fish Tambaqui, *Colossoma macropomum*: A Pilot Study. *Aquacultural Engineering*, 7: 113-125, 1988.
- PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197: 229-281, 2001.
- REIS, V. R. Feminização de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) com administração de 17 β -estradiol na dieta. 2015. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos) - Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias. Manaus, 2015.

- REIS-FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C. de; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 4, 817-822, 2006.
- ROTHBARD, S.; ZOHAR, Y.; ZMORA, N.; SIVAN, B. L.; MOAV, B.; YARON, Z. Clearance of 17--ethynyltestosterone from muscle of sex-inversed tilapia hybrids treated for growth enhancement with two doses of the androgen. *Aquaculture*, Amsterdam, 89(3/4): 365-376, 1990.
- SANTOS, L.; FILHO, M. P.; SOBREIRA, C.; ITUASSÚ, D.; FONSECA, F. A. L. da. Exigência protéica de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após privação alimentar. *Acta Amazonica*, 40(3): 597 – 604, 2010.
- SENASA. Resolução 06/2004. Disponível em: <<https://viejaweb.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=993&io=2360>>. Acesso em: 8 de jun. 2016.
- VICH Topic GL49 (MRK) – “Metabolism and Residue Kinetics. Guideline for the Validation of Analytical Methods used in Residue Depletion Studies”, February 2011.
- WANG, Y., HU, M., WANG, W., LIU, X., CHEUNG, S. G., SHIN, P. K. S., SONG, L. Dynamic Microwave-Assisted Extraction Coupled with Salting-Out Liquid-Liquid Extraction for Determination of Steroid Hormones in Fish Tissues. *Agric. Food Chem.*, 60: 10343–10351, 2012.
- XU, C. L., CHU, X. G., PENG, C. F., JIN, Z. Y., WANG, L. Y. Development of a faster determination of 10 anabolic steroids residues in animal muscle tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 616–621, 2006.
- ZANARDI, M. F. Determinação de resíduo hormonal na carcaça de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) após reversão sexual. 2007. 87f. Tese (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal - SP, 2007.

DISCUSSÃO GERAL

A vantagem do uso da técnica de reversão sexual em peixe é a criação de população de monossexo, pois em alguns grupos de peixes as fêmeas apresentam taxas de crescimento mais elevadas do que os machos e vice-versa (PIFERRER, 2001). Para o comércio isso pode trazer outros benefícios, como supressão da reprodução (evitando o problema de superpopulação), contenção de gastos energéticos com a atividade reprodutiva, uniformidade de tamanho na colheita e aumento da produtividade (BEM, 2009; Singh, 2013). Em tambaqui, a melhor opção para aumentar a produtividades seria criar população de monossexo de fêmea por mostrar superioridade na taxa de crescimento do que o macho (IZEL *et al.*, 2013).

Essa técnica pode também trazer desvantagens, como causar risco na saúde do consumidor (caso seja manuseado de modo ilegal ou fora das boas práticas pecuárias) quando ingerir alimento contaminado com resíduo de hormônio. Na criação de bagre, *Pseudobagrus fulvidraco*, as altas dosagens do estradiol na ração (20ppm e 40ppm) tornam-se um processo estressante, resultando em baixas taxas de sobrevivência e, também, causam decréscimo no crescimento do peixe (PARK *et al.*, 2004). Pode gerar, também, retardamento da maturidade sexual, redução da fecundidade dos peixes, e se manusear em altas dosagens podem levar a esterilidade, reversão sexual paradoxal e supressão no crescimento (PANDIAN e SHEELA, 1995).

A reversão sexual pode se tornar uma técnica capaz de poluir o ambiente, pois mais de 99 % dos hormônios são metabolizados e liberados dentro de poucas horas ou dias nas águas de criação (PANDIAN e SHEELA, 1995). Para linguado, *Paralichthys dentatus*, mediu-se o nível de estradiol no corpo e concluiu-se que 24 horas após o tratamento hormonal, o animal estava no mesmo nível do grupo controle o qual não obteve o tratamento. Em compensação, o tanque de criação dos alevinos, que inicialmente continha 0,01nM de estradiol na água, após 24h a concentração aumentou para 0,34nM (SPECKER e CHANDLEE, 2003). Portanto, para garantir a segurança ambiental do procedimento, a maneira para de eliminar resquícios do 17 β -estradiol no tanque de criação seria por cloração, usando solução de cloro na concentração de 0,075 g/L, cinco dias após o término do experimento. Reis

(2015) verificou que 30 dias após cloração, não foi mais detectada a presença do hormônio na água.

A utilização da reversão sexual, conforme as boas práticas pecuárias, não constitui perigo para a saúde humana. Além disso, o 17β -estradiol, utilizado na feminização do tambaqui muito meses antes da comercialização, por ser um hormônio natural é facilmente metabolizado em menos de um mês após o término do período de tratamento hormonal (PIFERRER, 2001), não mais apresenta riscos de contaminação da carne por hormônio.

A melhor técnica de reversão sexual, sem correr o risco de ingerir produto final contendo resíduo de hormônio, seria utilizando o tratamento hormonal por via indireta. Apesar de ser um processo um pouco demorado pelo fato de envolver duas gerações ou mais, seria possível criar populações de monossexo, tanto macho quanto fêmea, por haver um número reduzido de peixes submetidos ao tratamento hormonal e que serão utilizados apenas como reprodutores (PIFERRER, 2001; BEM, 2009). Na criação de população fêmea (homogamética - $XX_{\text{♀}}$), inicialmente o tratamento será por processo direto, com andrógeno, para formação de fêmea masculinizada (fenótipo macho com gene feminino - $XX_{\text{♂}}$). Em seguida, esta população fêmea será cruzada com a fêmea normal ($XX_{\text{♀}}$) para gerar população 100% fêmea. Na produção de população macho (heterogamético - $XY_{\text{♂}}$), cria-se o macho feminizado (fenótipo feminino com gene masculino - $XY_{\text{♀}}$) a partir do uso de estrógeno, para gerar descendente “supermacho” ($YY_{\text{♂}}$) após cruzar com macho normal ($XY_{\text{♂}}$). Com isso, o cruzamento com a fêmea normal ($XX_{\text{♀}}$) gera população 100% macho (PIFERRER, 2001).

O tratamento pode ser realizado por imersão ou por ração tratada com o hormônio, por ser possível manipular em grande quantidade de peixe. Mas é preciso otimizar vários parâmetros, como idade das larvas, densidade de estocagem, dose e concentração do hormônio, tempo de tratamento, etc., antes de ser utilizada para produção comercial. Caso contrário, o tratamento pode não surtir efeito ou mesmo causar efeitos negativos (BEM, 2009).

Apesar de existir maneiras de obter alimentos livre de resíduo hormonal, por se tratar de processo demorado, muitos produtores optam por método de rápido resultado, que seria a técnica de reversão sexual por via direta. Portanto, por questões de segurança alimentar, é necessário determinar e

quantificar os possíveis resíduos de hormônio na carne do peixe e também verificar que o tratamento hormonal é eficiente e não deixa resíduos no alimento.

A técnica cromatográfica acoplada à espectrometria de massa em tandem é a mais empregada para detecção e quantificação de fármacos veterinários e resíduos de contaminantes em diversas matrizes. A técnica tem a capacidade de analisar grande quantidade de compostos em uma corrida. Porém, o método multirresíduo requer muita experiência, recursos e tempo, para sua elaboração. São poucos os métodos existentes que usam a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) para determinar 17 β -estradiol no músculo de peixe (XU et al., 2006; JAKIMSKA et al., 2013). Assim sendo, foi desenvolvido um método para identificar o hormônio na matriz de tambaqui (amostra enviada pela Embrapa) e para verificar se houve presença do hormônio sete meses após finalizar o tratamento (REIS, 2015).

CONCLUSÃO GERAL

O método analítico desenvolvido e validado para a determinação de 17 β -estradiol no músculo do tambaqui apresentou limite de detecção de 0,3 ng.g⁻¹ e de quantificação de 1,0 ng.g⁻¹, sendo que as amostras de músculo do tambaqui tratado não apresentaram resíduos detectáveis do hormônio. Assim, pode-se concluir que a carne do peixe tratado com o hormônio, através da dieta, para fins de reversão sexual, não representa risco à saúde humana decorrente da presença desse composto.

REFERÊNCIAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO 22000: Sistemas de gestão da segurança de alimentos – Requisitos para qualquer organização na cadeia produtiva de alimentos. Rio de Janeiro, 2006.
- ALDA, M. J. L. de, BARCELO, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 911: 203–210, 2001.
- ALDA, M. J. L. de, DÍAZ-CRUZ, S., PETROVICA, M., BARCELO, D. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A*, 1000: 503–526, 2003.
- ALMEIDA, C., NOGUEIRA, J. M. F. Determination of steroid sex hormones in real matrices by bar adsorptive microextraction (BA μ E). *Talanta*, 136: 145–154, 2015.
- ALMEIDA, F.L. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, 37(2): 174-180, 2013. Available from: <www.cbpa.org.br>.
- ALVES, C., FLORES, L. C., CERQUEIRA, T. S., TORALLES, M. B. P. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 23(5): 1005-1014, 2007.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction "for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 2003.
- ANDRADE, D. R., YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, 27(2): 166-172, 2003.
- ARAÚJO, J. E. X. S., JR, D. P. S., RIBEIRO, J. S. DE A., MARTINS, E. de F. F., SOUZA, F. N., OLIVEIRA, C. A. L. de, RIBEIRO, R. P., LOPERA-BARRERO, N. M., POVH, J. A. Ovopel and Carp Pituitary Extract as Spawning Inducers in Males of the Amazon Catfish *Leiarius marmoratus* (Gill,1970). *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 57(6): 882-886, 2014.
- ARDREY, R. E. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, Wiley: Huddersfield, 2003.

- BAILEY, J.; CARON, E.; CESSNA, A. J.; FARENHORST, A.; SHEEDY, C. Maximizing Sensitivity in the LC-MS/MS Determination of Estrone (E1), 17 β -Estradiol (E2), Estriol (E3) and 17 α -Ethinyl Estradiol in Natural Waters. Western Canada Trace Organics Workshop. Calgary, Alberta, 2007.
- BEM, J. C. de. Desenvolvimento gonadal inicial e reversão sexual em *Astyanax altiparanae* (Teleostei, characidae). 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.
- BERLINSKY, D. L., KING V, W., SMITH, T. I. J. The use of luteinizing hormone releasing hormone analogue for ovulation induction in black sea bass (*Centropristis striata*). *Aquaculture*, 250: 813– 822, 2005.
- BILA, D. M. e DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Quim. Nova*, 30(3): 651-66, 2007.
- BILA, D. M. e DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Quim. Nova*, 26(4): 523-530, 2003.
- BLASCO, C., POUCKE , C. V., PETEGHEM, C. V. Analysis of meat samples for anabolic steroids residues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1154: 230–239, 2007.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA): Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29 de Maio de 2003. Diário Oficial da União. Brasília, 2003.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA): Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>. Acesso em: 17/11/2016
- BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção da Pecuária Municipal – 2015. Prod. Pec. munic., Rio de Janeiro, 43: 1-49, 2015b.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Instrução Normativa No42, de 20 de Dezembro de 1999. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 1999.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUARIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa SDA No11, de 7 de Maio de 2014. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 2014.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUARIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa SDA No13, de 15 de Julho de 2015. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 2015a.

- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Manual de garantia da qualidade analítica. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Portaria nº 51 de 24 de maio de 1991. Diário Oficial da União, Brasília. Seção I, p.9989, 1991.
- BRASIL. MINISTROS DE ESTADO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA - MAARA. Relatório apresentado pelos membros da comissão nomeada pelo Ministério da Agricultura, do Abastecimento e Reforma Agrária através da portaria nº. 51 sobre o uso de promotores do crescimento hormonal em pecuária de corte. Brasília. 130p, 1994.
- CARDOSO, O. M. C.; SILVA, T. J. P.; SANTOS, W. L. M. Ocorrência de resíduos de dietilestilbestrol e zeranol em fígado de bovinos abatidos no Brasil. Ciênc. Tecnol. Alim., Campinas, 19(3): 1001–1014, 1999.
- CODEX ALIMENTARIUS. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. CAC/MRL N.º 02/2015 de Julho/2015.
- COMMISSION DECISION (EC) 657/2002 of 12 August 2002 on implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of European Union, p. 8-36, 2002.
- COMMISSION REGULATION (EC) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Union, p. 50, 2010.
- CURTIS, L. R.; DIREN, F. T.; HURLEY, M. D.; SEIM, W. K.; TUBB. R. A. Disposition and elimination of 17- α -methyltestosterone in Nile tilapia. Aquaculture, Amsterdam, 99(1): 193-201, 1991.
- DASGUPTA, S., SARKAR, S. K., SARANGI, N., BHATTACHARYA, S. Variation in spawning responses, egg and larvae productions from induced rohu (*Labeo rohita*) during pre-monsoon and monsoon seasons: Relationship with hormonal changes and oocyte responsiveness during final maturation. Aquaculture, 290: 320–326, 2009.
- DIMAGGIO, M. A., BROACH, J. S., OHS, C. L. Evaluation of Ovaprim and human chorionic gonadotropin doses on spawning induction and egg and larval quality of pinfish, *Lagodon rhomboides*. Aquaculture, 414–415: 9–18, 2013.
- DRAISCI, R., PALLESCHI, L., FERRETTI, E., LUCENTINI, L., CAMMARATA, P. Quantitation of anabolic hormones and their metabolites in bovine serum and urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 870: 511–522, 2000.

- DUARTE, K. M. R., SILVA, F. M. S. M. DA, MEIRELLES, C. F. Resíduos de anabolizantes na produção animal: Importância e métodos de detecção. *Cienc. Rural*, Santa Maria, 32(4): 731-737, 2002.
- EL-SAYED, A. M., ABDEL-AZIZ, E. H., ABDEL-GHANI, H. M. Effects of phytoestrogens on sex reversal of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae fed diets treated with 17 α -Methyltestosterone. *Aquaculture*, 360–361: 58–63, 2012.
- EPSTEIN, S. S. Chemical additives in beef industry. Section on environmental health policy. *Int. J. Health Serv.*, New York, 20(2): 277-280, 1990.
- FALONE, S. Z. Desenvolvimento de métodos para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona em amostras de água e de sedimentos de piscicultura: ensaios ecotoxicológicos com cladóceros. 179f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- FAN, Y., YIN, Y., JIANG, W., CHEN, Y., YANG, J., WU, J., XIE, M. Simultaneous determination of ten steroid hormones in animal origin food by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 142: 170–177, 2014.
- FAO - ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. El estado mundial de la pesca y la acuicultura: Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp, 2016.
- FERNANDES, A. N., GIOVANELA, M., ALMEIDA, C. A. P., ESTEVES, V. I., SIERRA, M. M. D., GRASSI, M. T. Remoção dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfas decompostas como material adsorvente. *Quim. Nova*, 34(9): 1526-1533, 2011.
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., SCHUCHARDT, D., ROO, J., HERNÁNDEZ-CRUZ, C., IZQUIERDO, M. Spawn quality and GnRH α induction efficiency in longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) broodstock kept in captivity. *Aquaculture*, 435: 167–172, 2015.
- FERRETTI, G., FERRANTI, C., CROVELLA, T., FIORI, M., CIVITAREALE, C., MARCHIAFAVA, C., QUADRI, F., CAMMARATA, P., PALLESCHI, L. Simultaneous analysis of 17 α -estradiol and 17 β -estradiol in bovine serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 871: 135–140, 2008.
- FREITAS, A., BARBOSA, J., RAMOS, F. Avaliação do desempenho de métodos analíticos de pesquisa de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal: Limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β). *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 2(1):83-88, 2012.

- GARBER, A. F., FORDHAM, S. E., SYMONDS, J. E., TRIPPEL, E. A., BERLINSKY, D. L. Hormonal induction of ovulation and spermiation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 296: 179–183, 2009.
- GUEDES-ALONSO, R., MONTESDEOCA-ESPONDA, S., SOSA-FERRERA, Z., SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Liquid chromatography methodologies for the determination of steroid hormones in aquatic environmental systems. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 3–4: 14–27, 2014.
- HAFFRAY, P., PETIT, V., GUIGUEN, Y., QUILLET, E., RAULT, P., FOSTIER, A. Successful production of monosex female brook trout *Salvelinus fontinalis* using gynogenetic sex reversed males by a combination of methyltestosterone immersion and oral treatments. *Aquaculture*, 290: 47–52, 2009.
- HANCZ, C. Performance of the Amazonian Tambaqui, *Colossoma macropomum*, in Pond Polyculture. *Aquacultural Engineering*, 12: 245–254, 1993.
- HARTMANN, S., LACORN, M., STEINHART, H. Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food Chemistry*, 62(1): 7–20, 1998.
- HAYASHI, C., BOSCOLO, W. R., SOARES, C. M., MEURER, F. Exigência de Proteína Digestível para Larvas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a Reversão Sexual. *R. Bras. Zootec.*, 31(2): 823–828 (suplemento) , 2002.
- HENDRY, C. I., MARTIN-ROBICHAUD, D. J., BENFEY, T. J. Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 219: 769–781, 2003.
- HEYRATI, F. P., MOSTAFAVI, H., TOLOEE, H., DORAFSHAN, S. Induced spawning of kutum, *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) using (D-Ala6, Pro9-NET) GnRHa combined with domperidone. *Aquaculture*, 265: 288–293, 2007.
- HU, Y., WANG, Y., CHEN, X., HU, Y., LI, G. A novel molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber coupled with high performance liquid chromatography for analysis of trace estrogens in fishery samples. *Talanta*, 80: 2099–2105, 2010.
- IBARRA-CASTRO, L., DUNCAN, N. J. GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture*, 272: 737–746, 2007.
- INGRAND, V., HERRY, G., BEAUSSE, J., ROUBIN, M. R. de. Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1020: 99–104, 2003.

- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008 – Revisão 01, Rio de Janeiro, Março de 2003.
- ISOBE, T., SHIRAISHI, H., YASUDA, M., SHINODA, A., SUZUKI, H., MORITA, M. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 984: 195–202, 2003.
- IZEL, A. C. U.; CRESCÊNCIO, R.; O’SULLIVAN, F. F. L. de A.; CHAGAS, E. C.; BOIJINK, C. de L.; SILVA, J. I. Circular Técnica 39: Produção Intensiva de Tambaqui em Tanques Escavados com Aeração. Embrapa, Manaus, 2013.
- JAKIMSKA, A., HUERTA, B., BARGANSKA, Z., KOT-WASIK, A., RODRÍGUEZ-MOAZ, S., BARCELÓ, D. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers. *Journal of Chromatography A*, 1306: 44–58, 2013.
- JECFA. FAO/WHO - Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Geneva: World Health Organization, 41p. Technical Report Series, 763, 1988.
- JECFA. FAO/WHO - Expert Committee on Food Additives. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Geneva: World Health Organization, WHO Food additives series: 43, 2000.
- JIANG, T., ZHAO, L., CHU, B., FENG, Q., YAN, W., LIN, J. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of 17-estradiol in fishery samples with high performance liquid chromatography. *Talanta*, 78: 442–447, 2009.
- JOHNSTONE, R., MACINTOSH, D. J., WRIGHT, R. S. Elimination of orally administered 17 methyltestosterone by *Oreochromis mossambicus* (tilapia) and *Salmo gairdneri* (rainbow trout) juveniles. *Aquaculture*, Amsterdam, 35: 249-257, 1983.
- JOHNSTONE, R., SIMPSON, T.H. AND YOUNGSON, A.F. Sex reversal in salmonid culture. *Aquaculture*, 13: 115-134, 1978.
- KAKLAMANOS, G., THEODORIDIS, G., DABALIS, T. Determination of anabolic steroids in muscle tissue by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216: 8072–8079, 2009.
- KANEMARU, T., NAKAMURA, M., MURATA, R., KUROKI, K., HORIE, H., UCHIDA, K., SENTHILKUMARAN, B., KAGAWA, H. Induction of sexual maturation of the female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, in the non-breeding season by modulating environmental factors with GnRH analogue implantation. *Aquaculture*, 358–359: 85–91, 2012.

- LEE, C. S., TAMARU, C. S., BANNO, J. E., KELLEY, C. D., BOCEK, A., WYBAN, J. A. Induced maturation and spawning of milkfish, *Chanos chanos forsskal*, by hormone implantation. *Aquaculture*, 52: 199-205, 1986.
- LEONHARDT, J. H. Efeito da reversão sexual em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). 141f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista - Campus Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Centro de Aquicultura, São Paulo, 1997.
- LEVAVI-SIVAN, B., VAIMAN, R., SACHS, O., TZCHORI, I. Spawning induction and hormonal levels during final oocyte maturation in the silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture*, 229: 419–431, 2004.
- LIN, S., BENFEY, T.J., MARTIN-ROBICHAUD, D. J. Hormonal sex reversal in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture*, 364–365: 192–197, 2012.
- LONG, Z., HONG, L., JIE, J. Determination of β -Estradiol Residues in Fish/Shellfish Muscle by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chin J Anal Chem*, 35(7): 983–987, 2007.
- LOPES, L. G., MARCHI, M. R. R., SOUZA, J. B. G., MOURA, J. A., LORENZON, C. S., CRUZ, C., AMARAL, L. A. Estrôgenios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – São Paulo. *Quim. Nova*, 33(3): 639-643, 2010.
- MAINARDES-PINTO, C. S. R., FENERICH-VERANI, N., CAMPOS, B. E. S. DE, SILVA, A. L. da. Masculinização da Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, Utilizando Diferentes Rações e Diferentes Doses de 17 α -Metiltestosterona. *Rev. bras. zootec.*, 29(3): 654-659, 2000.
- MARINO, G., PANINI, E., LONGOBARDI, A., MANDICH, A., FINOIA, M.G., ZOHAR, Y., MYLONAS, C.C. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRHa implant. *Aquaculture*, 219: 841–858, 2003.
- MELARD, C. Production of a high percentage of male offspring with 17 α -ethynylestradiol sex-reversed *Oreochromis aureus*. I. Estrogen sex-reversal and production of F2 pseudofemales. *Aquaculture*, 130: 25-34, 1995.
- MEROLA, N.; PAGÁN-FONT, F. A. Pond Culture of the Amazon Fish Tambaqui, *Colossoma macropomum*: A Pilot Study. *Aquacultural Engineering*, 7: 113-125, 1988.
- MYLONAS, C. C., MITRIZAKIS, N., CASTALDO, C. A., CERVIÑO, C. P., PAPADAKI, M., SIGELAKI, I. Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity II. Hormonal induction of spawning and monitoring of spawning kinetics, egg production and egg quality. *Aquaculture*, 414–415: 318–327, 2013.

- MYLONAS, C. C., PAPANDROULAKIS, N., SMBOUKIS, A., PAPADAKI, M., DIVANACH, P. Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerili*) using GnRHa implants. *Aquaculture*, 237: 141–154, 2004.
- PALERMO-NETO, J. Anabolizantes e Pecuária de Corte. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP*, São Paulo, fascículo 1, 1: 010-015, 1998.
- PANDIAN, T.J., SHEELA, S.G. Review: Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, 138: 1-22, 1995.
- PARK, I., KIM, J., CHO, S. H., KIM, D. S. Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson). *Aquaculture*, 232: 183–193, 2004.
- PARTSCH, C. J., SIPPELL, W. G. Pathogenesis and epidemiology of precocious puberty. Effects of exogenous oestrogens. *Hum Reprod Update*, 7(3): 292-302, 2001.
- PASSINI, G. Indução da inversão sexual de machos do rabalo-flecha, *Centropomus undecimalis*, com implantes do hormônio 17 β -estradiol. 47f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrária, Florianópolis - SC, 2013.
- PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197: 229-281, 2001.
- RASINES, I., GÓMEZ, M., MARTÍN, I., RODRÍGUEZ, C., MAÑANÓS, E., CHEREGUINI, O. Artificial fertilisation of cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Effects of the time of day of hormonal treatment on inducing ovulation. *Aquaculture*, 392–395: 94–97, 2013.
- REIS FILHO, R. W., ARAÚJO, J. C. DE, VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. *Quim. Nova*, 29(4): 817-822, 2006.
- REIS, V. R. Feminização de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) com administração de 17 β -estradiol na dieta. 2015. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos) - Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias. Manaus, 2015.
- ROTHBARD, S.; ZOHAR, Y.; ZMORA, N.; SIVAN, B. L.; MOAV, B.; YARON, Z. Clearance of 17 α -ethynyltestosterone from muscle of sex-inversed tilapia hybrids treated for growth enhancement with two doses of the androgen. *Aquaculture*, Amsterdam, 89(3/4): 365-376, 1990.
- SANTOS, L.; FILHO, M. P.; SOBREIRA, C.; ITUASSÚ, D.; FONSECA, F. A. L. da. Exigência protéica de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após privação alimentar. *Acta Amazonica*, Vol. 40(3): 597 – 604, 2010.

- SENASA. Resolução 06/2004. Disponível em: <<https://viejaweb.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=993&io=2360>>. Acesso em: 8 de jun. 2016.
- SHAO, B., ZHAO, R., MENG, J., XUE, Y., WU, G., HU, J., TU, X. Simultaneous determination of residual hormonal chemicals in meat, kidney, liver tissues and milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 548: 41–50, 2005.
- SHI, Y., PENG, D., SHI, C., ZHANG, X., XIE, Y., LU, B. Selective determination of trace 17 β -estradiol in dairy and meat samples by molecularly imprinted solid-phase extraction and HPLC. *Food Chemistry*, 126: 1916–1925, 2011.
- SINGH, A. K. Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes *General and Comparative Endocrinology*, 181: 146–155, 2013.
- SPECKER, J. L., CHANDLEE, M. K. Methodology for estradiol treatment in marine larval and juvenile fish: uptake and clearance in summer flounder. *Aquaculture*, Amsterdam, 217: 663-672, 2003.
- SUGUMAR, V., MUNUSWAMY, N. Induction of population growth, mictic female production and body size by treatment of a synthetic GnRH analogue in the freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus* Pallas. *Aquaculture*, 258: 529–534, 2006.
- SZABÓ, T., MEDGYASSZAY, C., HORVÁTH, L. Ovulation induction in nase (*Chondrostoma nasus*, Cyprinidae) using pituitary extract or GnRH analogue combined with domperidone. *Aquaculture*, 203: 389–395, 2002.
- TABATA, Y. A., RIGOLINO, M. G., TSUKAMOTO, R. Y. Produção de lotes monossexos femininos triploides de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Salmonidae). III - Crescimento até idade de primeira maturação sexual. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 25 (único): 67-76, 1999.
- TARANGER, G. L., CARRILLO, M., SCHULZ, R. W., FONTAINE, P., ZANUY, S., FELIP, A., WELTZIEN, F. A., DUFOUR, S., KARLSEN, O., NORBERG, B., ANDERSSON, E., HANSEN, T. Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 483–515, 2010.
- TARGOŃSKA, K., KUCHARCZYK, D., KUJAWA, R., MAMCARZ, A., ŻARSKI, D. Controlled reproduction of asp, *Aspius aspius* (L.) using luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) analogues with dopamine inhibitors. *Aquaculture*, 306: 407–410, 2010.
- TOYAMA, G. N., CORRENTE, J. E.; CYRINO, J. E. P. Suplementação de vitamina C em rações para reversão sexual da tilápia do nilo. *Scientia Agricola*, 57(2): 221-228, 2000.

- VAZIRZADEH, A., AMIRI, B. M., YELGHI, S., HAJIMORADLOO, A., NEMATOLLAHI, M. A., MYLONAS, C. C. Comparison of the effects of different methods of mammalian and salmon GnRHa administration on spawning performance in wild-caught female carp (*Cyprinus carpio*) from the Caspian Sea. *Aquaculture*, 320: 123–128, 2011.
- VENTURIERI, R., BERNARDINO, G. Hormônios na reprodução artificial de peixes. *Panorama da Aqüicultura*, 09(55): 39-48, 1999.
- VERBINNEN, R. F., NUNES, G. S., VIEIRA, E. M. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. *Quim. Nova*, 33(9): 1837-1842, 2010.
- VICH Topic GL49 (MRK) – “Metabolism and Residue Kinetics. Guideline for the Validation of Analytical Methods used in Residue Depletion Studies”, February 2011.
- WANG, H., ZHOU, X., ZHANG, Y., CHEN, H., LI, G., XU, Y., ZHAO, Q., SONG, W., JIN, H., DING, L. Dynamic Microwave-Assisted Extraction Coupled with Salting-Out Liquid-Liquid Extraction for Determination of Steroid Hormones in Fish Tissues. *Agric. Food Chem.*, 60: 10343–10351, 2012.
- WANG, Q., ZHANG, A., PAN, X., CHEN, L. Simultaneous determination of sex hormones in egg products by ZnCl₂ depositing lipid, solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 678: 108–116, 2010.
- WANG, Y., HU, M., WANG, W., LIU, X., CHEUNG, S. G., SHIN, P. K. S., SONG, L. Effects of GnRHa (D-Ala6, Pro9-NEt) combined with domperidone on ovulation induction in wild loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture*, 291: 136–139, 2009.
- WANG, Y., HU, M., WANG, W., LIU, X., CHEUNG, S. G., SHIN, P. K. S., SONG, L. Dynamic Microwave-Assisted Extraction Coupled with Salting-Out Liquid-Liquid Extraction for Determination of Steroid Hormones in Fish Tissues. *Agric. Food Chem.*, 60, 10343–10351, 2012.
- XU, C. L., CHU, X. G., PENG, C. F., JIN, Z. Y., WANG, L. Y. Development of a faster determination of 10 anabolic steroids residues in animal muscle tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 616–621, 2006.
- YANG, Y., SHAO, B., ZHANG, J., WU, Y., DUAN, H. Determination of the residues of 50 anabolic hormones in muscle, milk and liver by very-high-pressure liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877: 489–496, 2009.
- YING, G., KOOKANA, R. S., RU, Y. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*, 28: 545–551, 2002.

- ZANARDI, M. F. Determinação de resíduo hormonal na carcaça de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) após reversão sexual. 87f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da UNESP Campus de Jaboticabal - CAUNESP, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2007.
- ZANARDI, M. F., KOBERSTEIN, T. C. R. D., URBINATI, E. C., FAGUNDES, M., SANTOS, M. A. DOS, MATAQUEIRO, M. I. Concentrações de hormônio na carcaça de tilápias-do-nilo e maturação precoce após reversão sexual. R. Bras. Zootec., 40(1): 7-11, 2011.
- ZANONI, M. A., LEAL, T. V., FILHO, M. C., OLIVEIRA, C. A. L. DE, RIBEIRO, R. P. Inversão sexual de alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade Supreme, submetidos a diferentes temperaturas durante fase de diferenciação sexual. Ciências Agrárias, Londrina, 34(1): 455-466, 2013.
- ZHOU, J. L., ZHANG, Z. Capítulo 9: Analysis of Hormones in Food. Analysis of Endocrine Disrupting Compounds in Food, Blackwell Publishing, Ltd. p.243-254, 2011.
- ZOHAR, Y., MYLONAS, C. C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture, 197: 99–136, 2001.

ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Comissão de Ética no Uso de Animais



CEUA/UNICAMP

INFORMAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP - CEUA/UNICAMP - esclarece que não há necessidade de submeter o projeto intitulado **"Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de resíduo de 17 β -estradiol em tabaqui por LC-MS/MS"**, de responsabilidade do Prof. Dr. Felix G. R. Reyes (orientador) e da pós-graduanda Célia A. Hoga, para análise desta Comissão.

Justifica-se por se tratar de experimentos realizados apenas com filés e plasma de peixes recebidos da EMBRAPA, no âmbito do projeto "Formação de população monosexo de fêmeas de tabaqui (*Colossoma macropomum*)", Edital EMBRAPA: Chamada 09/2013 - Prioridades do Portfólio Aquicultura, Macroprograma 3, não havendo manipulação *in vivo* dos animais nesta Universidade.

Campinas, 30 de março de 2016.

L. Verinaud

Profa. Dra. LIANA MARIA CARDOSO VERINAUD
Presidente da CEUA/UNICAMP